ELEKTROCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN BIMOLEKULAREN LIPIDMEMBRANEN IN GEGENWART VON ENTKOPPLERN DER OXIDATIVEN PHOSPHORYLIERUNG

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ERNST BAMBERG

aus Lörrach/Deutschland

1971

Bamberg 1973

aku-Fotodruck

ELEKTROCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN BIMOLEKULAREN LIPIDMEMBRANEN IN GEGENWART VON ENTKOPPLERN DER OXIDATIVEN PHOSPHORYLIERUNG

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ERNST BAMBERG

aus Lörrach/Deutschland

Bamberg 1973

aku-Fotodruck

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der

Herren Professoren Dr. P. Läuger und Dr. F. Grün

Basel, den 29. 6. 1971

Prof. Dr. H. P. Laubscher

Dekan

UNIV. LEIDEN BIBL.

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Herrn Professor Dr. P. Läuger bin ich für sein Wohlwollen und für die vielen interessanten Anregungen zu der vorliegenden Arbeit zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt weiter Herrn Dr. B. Neumcke für die Hilfe bei der theoretischen Ausarbeitung der Dissertation und Herrn Dipl.-phys. B. Ketterer, dessen kollegialer Unterstützung ich mich stets vergewissern konnte.

Herrn O. Marschall gebührt mein Dank für die Hilfe beim Bau des elektronischen Teils der Apparatur, während Herrn F. Haschlar für die Anfertigung der mechanischen Teile mein Dank gilt.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	Einleitung	1
B	Allgemeine elektrochemische Eigenschaften von bimolekularen Lipidmembranen	6
C	Apparatives	9
	I. Apparatur zur Untersuchung von Lipidmembranen	9
	a) Meßzelle	9
	b) Austauschapparatur	10
	II. Methoden zur Messung von elektrischen Eigenschaften von Membranen	12
	a) Zweielektrodenmethode	12
	b) Vierelektrodenmethode	13
	c) Spannungssprungmethode	16
D	Experimente und Resultate	21
	I. Material und Methoden	21
	a) Ausgangsmaterial	21
	b) Methoden zur Herstellung von bimolekularen Lipidmembranen	23
	II. Untersuchung von Stromspannungskurven von Lipidmembranen in Gegenwart verschiedener Entkopplersubstanzen	25
	a) Vorversuche und Allgemeines über Stromspannungscharakteristiken von Lipidmembranen	25

Seite

b) Untersuchungen zum Ioneninjektionsmechanismus und zum Spiegelladungsmodell 28
1. Ioneninjektionsmechanismus 28
2. Spiegelladungsmodell 31
c) Zusammenfassung der Messungen von Stromspannungscharakteristiken von Lipidmembranen 36

III. Stationäre Leitfähigkeitsmessungen im linearen Bereich der Stromspannungscharakteristik und Potentialmessungen 37
a) Diskussion der vorhandenen Modelle zur Erklärung des Ionentransports 37
b) Stationäre Leitfähigkeitsmessungen in Gegenwart von Pikrinsäure und 2,4 Dinitrophenol und Potentialmessungen in Gegenwart von Pikrinsäure 40

IV. Untersuchung des Ionentransportmechanismus mit Hilfe von Relaxationsmessungen in Gegenwart von TTFB 45
a) Modifiziertes Bruner-Modell 45
1. Physikalische Begründung der Existenz von Bindungsstellen in den Grenzflächen von Membranen 45
2. Berechnung des Einschaltstromes $I_{t=0}$ (I_0) mit Hilfe des modifizierten Bruner-Modells 46
2.1 Modifizierung des Modells 46
2.2 Transportmechanismen 47
2.3 Berechnung der Bindungsstellenkonzentrationen im Gleichgewicht 53
2.4 Berechnung der Leitfähigkeit zur Zeit t=0 55
2.5 Sättigungseffekte 57

Seite

b) Relaxationsmessungen und Resultate in Gegenwart von TTFB 61

1. Relaxationen in der Membran und an den Grenzflächen 61

2. Bestimmung von $\lambda_{t,0}$ (λ°) in Gegenwart von TTFB in Abhängigkeit vom pH und in Abhängigkeit von der Konzentration des zugegebenen TTFB 63

2.1 Versuchsbedingungen für die Messungen mit TTFB 63

2.2 Bestimmung von λ° in Abhängigkeit vom pH bei zwei verschiedenen Konzentrationen von TTFB 64

2.3 Bestimmung der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration des TTFB 68

c) Anwendung des modifizierten Bruner-Modells auf die Experimente mit TTFB 72

D Diskussion 79

E Zusammenfassung 86

F Literaturverzeichnis 88

Lebenslauf 93

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546026_0029

A Einleitung

Membranen spielen im Aufbau der lebenden Zelle eine wesentliche Rolle. Sie umschließen nicht nur eine ganze Zelle, sondern auch die in der Zelle vorhandenen Organellen, wie z.B. Zellkern und Mitchondrien. Membranen sind nicht nur Phasengrenzen, sondern es spielen sich in und an ihnen mannigfaltige biochemische Reaktionen und Transportprozesse ab. Während die chemische Zusammensetzung von Membranen z.B. der Mitochondrienmembranen der Rattenleber[4] - sie enthalten ca. 60 % Proteine, ca. 35 % Lipide und ca. 2 % Cholesterol - ziemlich gut bekannt ist, kann man über die Struktur, also die Anordnung der Moleküle in der Membran wenig aussagen. Es gibt eine ganze Reihe elektronenmikroskopischer Untersuchungen an ganz verschiedenartigen Membranen; die Ergebnisse führen immer wieder zu dem trilaminaren Bild, welches Robertson[2] als „unit membrane" interpretierte. Danielli und Davson[3] formulierten das nach ihnen benannte Membranmodell.

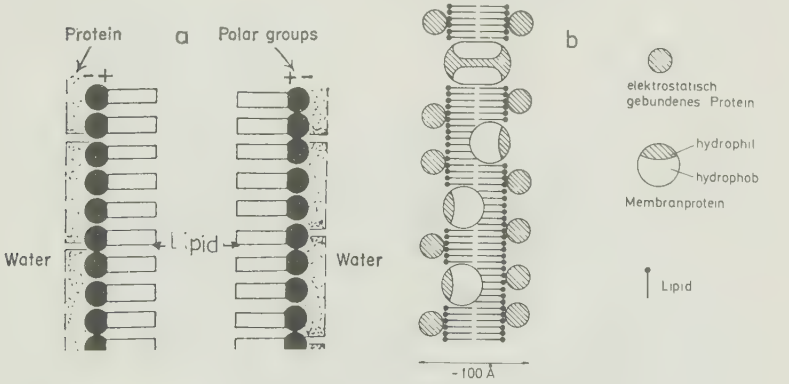


Fig. 1 a Unit-Membrane-Modell von Danielli-Davson
b Modifiziertes Membranmodell nach Danielli und Davson

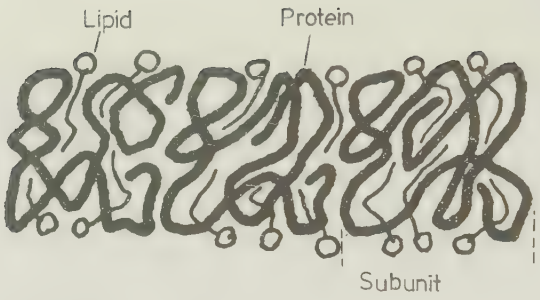


Fig. 1 c Subunit Membranmodell nach Benson und Green

Fig. 1 a zeigt das Modell von Danielli und Davson. Die Membran besteht im Innern aus einer Lipiddoppelschicht, welche auf beiden Seiten mit einer Proteinschicht belegt ist. Um die verschiedenartigste Wirkungsweise einer Membran zu erklären, ist das Modell zu grob, weil es keine differenzierte Aussage über die Anordnung der einzelnen Proteine macht.

Eine Verfeinerung des Modells ist die Annahme, daß die Proteine nicht nur auf der Oberfläche in einzelnen aktiven Gruppen liegen können, sondern die Membran völlig durchdringen und damit „Poren" in den hochisolierenden Lipiddoppelschichten bilden können (Fig. 1 b).

Als Alternative zu diesen Modellvorstellungen wird von Green[4] und Benson[5] eine Membranstruktur vorgeschlagen, die besagt, daß die Membran sich aus einzelnen Untereinheiten, den Lipoproteinen zusammensetzt (Fig. 1 c).

Eine wesentliche Aufgabe einer Membran ist es, den Stofftransport zu ermöglichen und zu regulieren, z.B. vom Zellinneren zu der die Zelle umspülenden Lösung. Diesen Transport kann man, sofern es sich um geladene Teilchen handelt, mit elektrochemischen Messungen untersuchen.

Müller und Rudin[6] entwickelten eine Technik, die es erlaubt aus einem wesentlichen Bestandteil einer Membran, den Lipiden, bimolekulare Modellmembranen herzustellen; diese sind für elektrochemische Messungen unter kontrollierten Bedingungen wesentlich leichter zugänglich, als biologische Membranen.

Lipide sind Moleküle, die aus einer polaren, also hydrophilen Gruppe und aus einer apolaren, also hydrophoben Gruppe bestehen. Das hat zur Folge, daß mit einer geeigneten Technik bimolekulare Schichten in wässriger Phase gebildet werden können; d.h. man ist in der Lage das Innere einer „unit membrane" künstlich herzustellen.

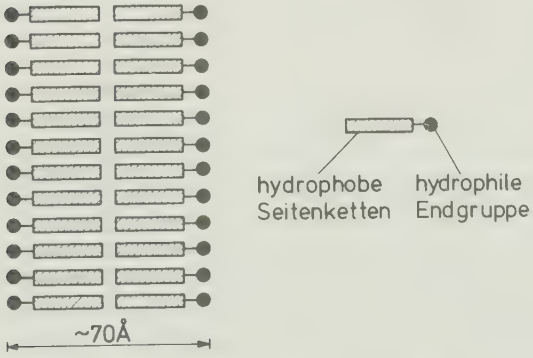


Fig.2 Lipiddoppelschicht

Fig.2 zeigt eine Lipiddoppelschicht, wo die polaren Gruppen der Moleküle nach der wässrigen Phase gerichtet sind, während die apolaren Gruppen nach Innen zeigen.

In Tabelle 1 sind einige Eigenschaften von künstlichen und natürlichen Membranen gegenübergestellt.[7,8]

Eigenschaft	natürliche Membran	künstliche Lipidmembran
Bild im Elektronenmikroskop	trilaminar	trilaminar
Dicke [Å]	60 - 100	60 - 75
Leitfähigkeit $[\Omega^{-1}\,cm^{-2}]$	$10^{-1} - 10^{-3}$	10^{-8} in Gegenwart von 10^{-1} M KCl
Kapazität $\left[\frac{\mu F}{cm^2}\right]$	0,5 - 1,3	0,3 - 0,4
Dielektrizitätskonstante	10 - 15	2

Tab.1

An Hand der Tabelle ist zu sehen, daß die bimolekulare Lipidmembran sich in Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante sehr stark von biologischen Membranen unterscheidet, während in den anderen angeführten Eigenschaften eine gute Übereinstimmung zu sehen ist.

In der vorliegenden Arbeit soll der Ionentransport durch bimolekulare Lipidmembranen in Gegenwart von schwachen organischen Säuren untersucht werden, deren Anionen durch hohe Ladungsdelokalisation eine relativ starke Lipidlöslichkeit besitzen. Solche Substanzen sind Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Bei diesen Prozeß, der sich in den Mitochondrien abspielt, wird durch eine Reihe hintereinandergeschalteter Redoxreaktionen Energie erzeugt, die zur Synthese von energiereichen Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat verwendet wird. Entkoppler haben die Eigenschaft,

die ATP-Synthese von den Redoxreaktionen zu „entkoppeln" in der Art, daß die zur Synthese notwendige Energie in Wärme oder andere Reaktionsprodukte umgesetzt wird. Mitchell[9] postuliert in seiner chemiosmotischen Theorie einen Protonengradienten über die wenig protonendurchlässige Mitochondrienmembran, welcher als Energiequelle für die ATP-Synthese wirkt. Nach Zusatz von Entkopplern wird nach dieser Hypothese die Membran für Protonen permeabel, so daß das Protonenpotential zusammenbricht und damit die ATP-Synthese gestoppt wird.

Tatsächlich wurde gefunden, daß durch Zusatz von Entkopplern die Leitfähigkeit von bimolekularen Lipidmembranen bis zu einem Faktor 10^6 erhöht wird.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, am Modellsystem der bimolekularen Lipidmembran den Ionentransportmechanismus in Gegenwart von Entkopplern mit Hilfe von elektrochemischen Messungen zu untersuchen.

B Allgemeine elektrochemische Eigenschaften von bimolekularen Lipidmembranen

Bimolekulare Lipidmembranen in wässriger Phase hergestellt, können als Dielektrikum eines Plattenkondensators aufgefaßt werden, wobei der sie umgebende Elektrolyt die Platten des Kondensators darstellt.

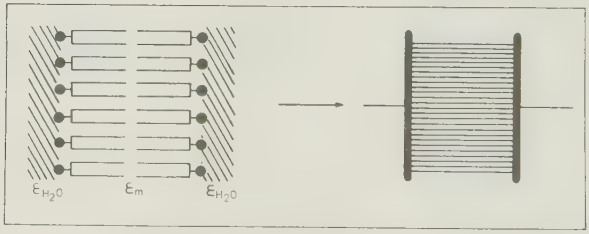


Fig. 3 Darstellung einer bimolekularen Lipidmembran als Plattenkondensator
ε_{H_2O} Dielektrizitätskonstante des Wassers
ε_m Dielektrizitätskonstante der Membran

Wenn man die aus optischen Reflektionsmessungen[10] bestimmte Dicke einer Membran von 60 Å verwendet, so ergibt sich für

die Dielektrizitätskonstante ε_m der Membran ein Wert $\varepsilon_m = 2$. Da eine bimolekulare Lipidmembran gleichzeitig neben der Kapazität eine bestimmte Leitfähigkeit besitzt, kann man folgendes Ersatzschaltbild formulieren:

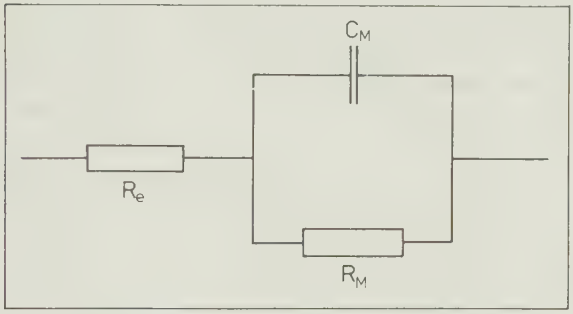


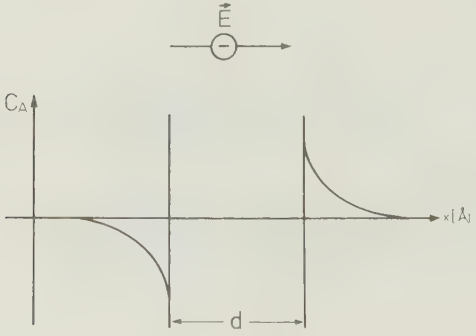
Fig. 4 Ersatzschaltbild einer bimolekularen Lipidmembran in wässriger Phase

R_e Elektrolytwiderstand
R_M Membranwiderstand
C_M Membrankapazität

R_e hängt von der Geometrie der Meßanordnung ab; bei den folgenden Versuchen ist R_e etwa gleich 100 Ω bei einer Ionenstärke von 10^{-1} M KCl. R_M beträgt je nach Zusatz von lipidlöslichen Ionen zu dem Elektrolyten in unserer Meßanordnung zwischen 10^2 und 10^9 Ω cm^2. Die Membrankapazität hat einen Wert von 33 μF/cm^2.

Die Spannungen, die man zur Messung der Leitfähigkeit über der Membran anlegen kann, belaufen sich in ihren Absolut-

werten zwischen 0 und 300 mV. Wenn man die Stromspannungskennlinien von Membranen aufnimmt, so zeigt sich, daß nur bis etwa 20 - 40 mV die Membranen sich wie ohm'sche Widerstände verhalten; bei höheren Spannungen nimmt der Strom wesentlich schneller zu als die Spannung. Eine weitere wichtige Erscheinung an Membranen ergibt sich beim Messen des Stromzeitverlaufs. Man beobachtet bei angelegter Spannung in Systemen mit hoher Stromdichte, daß der Strom durch die Membran mit der Zeit abnimmt und erst nach ca. 25 sec. einen konstanten Wert annimmt. Dieser Vorgang ist in vielen Fällen durch die aus der Elektrodenkinetik bekannten Diffusionspolarisation[11] verursacht. Die Diffusionspolarisation ist eine Grenzflächenerscheinung, die folgendermaßen beschrieben werden kann: infolge der hohen Stromdichte verarmt in Nähe der Elektroden oder in unserem Fall in Nähe der Membran[12] die ungerührte Schicht an Ladungsträgern bzw. sie reichert sich an, weil die Ionen nicht schnell genug hinzu bzw. wegdiffundieren können. Somit baut sich eine Gegenspannung auf, was zur Folge hat, daß der Strom sich verringert. Im Fall einer Membran sieht das Konzentrationsprofil in den Grenzschichten folgendermaßen aus, wenn wir negative lipidlösliche Ladungsträger betrachten:



$\vec{E}$ angelegtes elektrisches Feld

d Dicke der Membran in A

C_A Konzentration von Anionen

Fig. 5 Konzentrationsprofil von membranlöslichen Ionen in der Grenzfläche der Membran, hervorgerufen durch Diffusionspolarisation

C Apparatives

I. Apparatur zur Untersuchung von Lipidmembranen

a) Meßzelle

Um die im vorhergegangenen Kapitel beschriebenen Eigenschaften von bimolekularen Lipidmembranen untersuchen zu können, wurde folgende Zelle angefertigt, in der die bimolekularen Membranen hergestellt werden können.

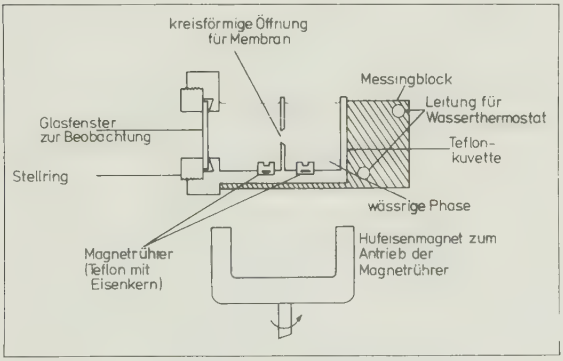


Fig. 6 Anordnung zur Herstellung von Lipidmembranen

Fig. 6 beschreibt die Meßzelle, die sich aus einer in zwei Kompartimente geteilten Küvette aus Teflon und einem die Küvette umschließenden thermostatisierbaren Messingblock zusammensetzt. Die runde Öffnung in der Zwischenwand der Küvette, auf der die Membran aufgezogen wird, hat einen Durchmesser von 3,25 mm,

was einer Fläche von ca. 8 mm^2 entspricht. Das Glasfenster dient zur Beobachtung der Membran. Ferner ist es möglich, mit einem unter der Küvette rotierenden Hufeisenmagneten mit Hilfe der Rührer in der Küvette die Lösung durchzurühren. Als Thermostat wurde ein Wasserthermostat der Fa.Lauda Typ N/515/12 verwendet.

b) Austauschapparatur

Für die vorliegenden Untersuchungen ist es interessant, bei derselben Membran das umgebende wässrige Milieu zu ändern, d.h. den Elektrolyt auf beiden Seiten der Membran gegen einen anderen auszutauschen. Ferner sollte es möglich sein, auf einer Seite der Membran den Elektrolyt auszutauschen, so daß man ein Konzentrationspotential für bestimmte Ionen erhält. Um den Elektrolyten einseitig oder beidseitig der Membran auszutauschen, wurde das sogenannte „pull and push"-Verfahren angewendet, d.h., da bimolekulare Lipidmembranen sehr instabil gegenüber mechanischen Einflüssen sind, wird der hydrostatische Druck durch gleichzeitiges Einfüllen und herausziehen von Lösung aus der Küvette möglichst konstant gehalten. Das Schema des Verfahrens ist in Fig. 7 dargestellt.

Um dieses Verfahren anzuwenden, wurde folgende Apparatur gebaut (Fig. 8).

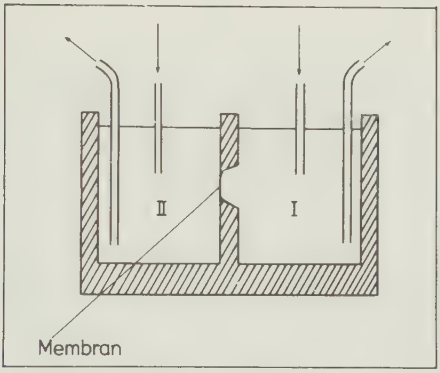


Fig. 7 Schema des "pull and push"-Verfahrens

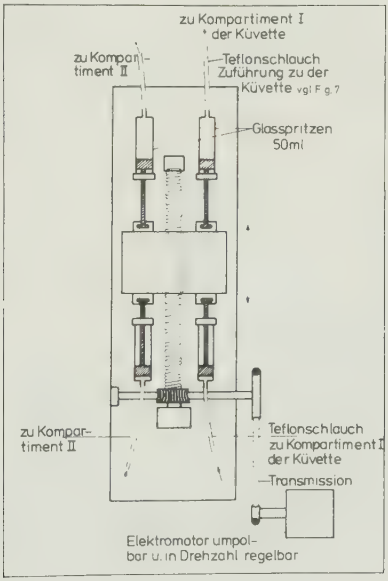


Fig. 8 Darstellung der Austauschapparatur

Mit der in Figur 8 dargestellten Apparatur ist es möglich, innerhalb von 6 - 8 Minuten 40 ml Lösung pro Kompartiment der Küvette auszutauschen.

II. Methoden zur Messung von elektrischen Eigenschaften von Membranen

a) Zweielektrodenmethode zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit von Lipidmembranen.

Die Leitfähigkeit und Stromspannungscharakteristiken von hochohmigen Lipidmembranen können am einfachsten mit der Zweielektrodenmethode gemessen werden. Man schließt die Membran in Serie mit einer variablen Spannungsquelle und mißt mit dem ebenfalls in Serie geschalteten Ampèremeter den Strom.

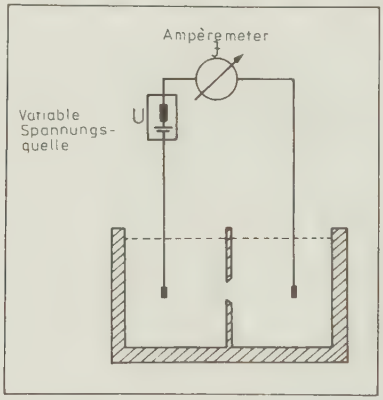


Fig. 9 Schaltschema für spannungskonstante Zweielektrodenmethode zur Messung der Membranleitfähigkeit

Als Elektroden können je nach Bedarf Kalomel- bzw. Silber-Silberchloridelektroden verwendet werden. Als Ampèremeter wurde ein Gerät Keithley 150 B gewählt, das erlaubt, Ströme bis zu 10^{-11} A zu messen.

Es wurde ferner eine variable Spannungsquelle angefertigt mit der es möglich ist, Spannungen zwischen -900 und +900 mV über der Membran anzulegen, und zwar in Stufen von 1, 6,5 und 60 mV.

b) Vierelektrodenmethode

Wird der Membranwiderstand durch Änderung des Systems um einen Faktor von 10^5 bis 10^6 heruntergesetzt, so ist die unter II a beschriebene spannungskonstante Zweielektrodenmethode nicht mehr anwendbar.

Da die Spannungsquelle einen Innenwiderstand von 20 kΩ hat, wird die angelegte Spannung über einem Membranwiderstand von $10^3\Omega$ nur noch 5 % der Ausgangsspannung der Spannungsquelle betragen. An Hand des Ersatzschaltbildes sind diese Verhältnisse sehr leicht einzusehen (Fig. 10).

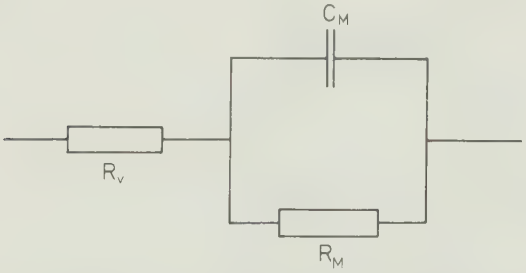


Fig. 10 Ersatzschaltung zur Erläuterung der Vierelektrodenmethode
Rv Summe aller der Membran vorgeschalteter Widerstände

Rv setzt sich zusammen aus dem Innenwiderstand der Spannungsquelle, des Ampèremeters, der Elektroden, der im Falle der von uns verwendeten Kalomelelektroden bei ca 10 kΩ liegt; d.h. wird $Rv \approx R_M$, so ist es

notwendig, die Spannung getrennt über der Membran abzugreifen, um die wahre über der Membran anliegende Spannung messen zu können.

Diese Methode hat auch den Vorteil, daß die bei hohen Stromdichten an Ag/AgCl-Elektroden auftretenden Polarisationen keine Verfälschung der Ergebnisse mehr liefern können.

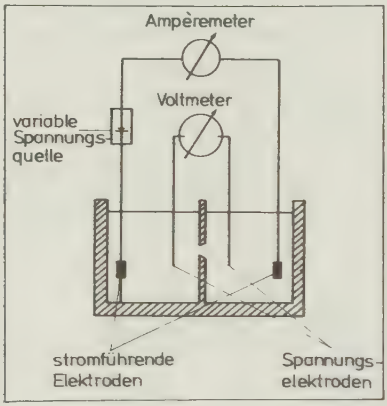


Fig. 11 Schaltprinzip für die Messung der Leitfähigkeit mit vier Elektroden

Für die Messung mit vier Elektroden wurde ein Gerät entwickelt, mit dem man in der Lage ist, alle eventuellen Verfälschungen bei den Messungen hervorgerufen durch zu hohen Innenwiderstand der Spannungsquelle bzw. der Elektroden auszuschließen. Das Gerät besteht aus einem niederohmigen Spannungsgenerator mit einer maximalen Ausgangsspannung von ± 10 V. Die hohen Aus-

gangsspannungen sind dann notwendig, wenn z.B. der Membranwiderstand sehr klein gegenüber dem Elektrodenwiderstand ist und somit dem System ein konstanter Strom aufgeprägt werden muß. Ferner ist es mit dem Gerät möglich, das auf der Basis eines Integrators einer Dreiecksspannung arbeitet, die Spannung sowohl kontinuierlich linear mit verschiedenem zeitlichen Anstieg von 1 mV/sec. bis 10 V/sec., wie auch punktförmig anzulegen. In das Gerät wurde ein hochohmiges Differenzelektrometer eingebaut, mit dem die an der Membran anliegende Spannung gemessen werden kann, die dann auf die x-Achse eines x-y-Schreibers gegeben wird. Der Strom wird mit Hilfe eines variablen Meßwiderstandes gemessen. Das Signal wird auf die y-Achse des x-y-Schreibers gegeben.

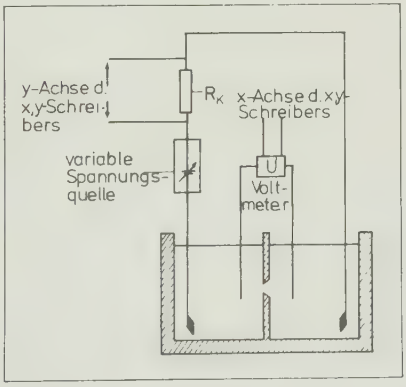


Fig. 12 Schaltung zur Aufnahme von Stromspannungskennlinien
R_K Ableitwiderstand zur Messung des Stromes

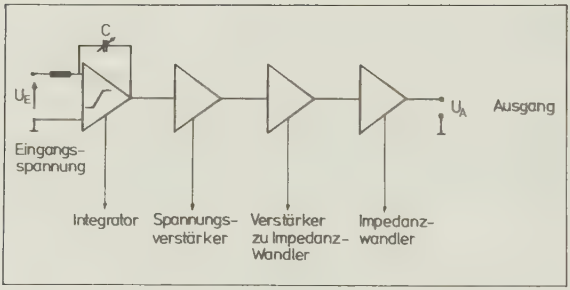


Fig. 13 Blockschaltbild des niederohmigen Spannungsgenerators

c) Spannungssprungmethode

Bei den Messungen mit der Vierelektrodenmethode ergab sich für hohe Stromdichten bei ca 10^{-4} A/cm^2 unter bestimmten Bedingungen, daß der Strom erst nach ca 25 sec einen konstanten Wert annahm. Dieses Phänomen kann z.T. mit der schon erwähnten Diffusionspolarisation an der Membran erklärt werden. Da die Diffusionspolarisation eine in unmittelbarer Nähe der Membran auftretende Erscheinung ist, kann man annehmen, daß der Strom, der stationär, also mit Diffusionspolarisation gemessen wird, gar nicht mehr membraninnere Vorgänge beschreibt; d.h. es ist interessant den Strom ohne Diffusionspolarisation zu beobachten. Aus diesem Grund wurde ein elektronischer Schalter mit einer Anstiegzeit von 3 μ s verwendet, der es erlaubt, die Spannung in sehr kurzer Zeit über der Membran anzulegen, um eventuelle Relaxationen vor oder in der Membran beobachten zu können. Der elektronische Schalter basiert auf dem Prinzip des astabilen Multivibrators.

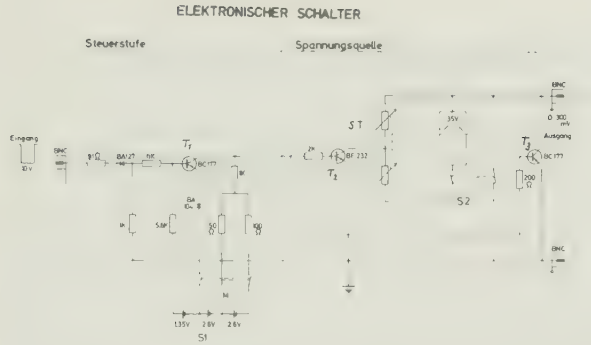


Fig. 14 Schaltbild des elektronischen Schalters
S_1 Schalter für Betriebsspannung
T_1 ist im Ruhezustand gesperrt;
die Sperrung wird durch den Steuerimpuls von -10V aufgehoben
S_2 Schalter für Ausgangsspannung der Spannungsquelle
ST Spannungsteiler

Der Schalter wurde getestet, indem der Einschaltvorgang direkt auf einen Oszillographen gegeben wurde.

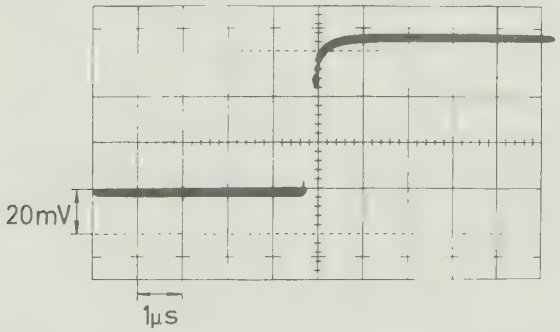


Fig. 15 Anstiegszeit der Ausgangsspannung des elektronischen Schalters

Fig. 15 zeigt, daß innerhalb von 3 μsec die volle Spannung erreicht ist.

Die Meßanordnung für Einschaltexperimente an Membranen ist in Fig. 16 zu sehen. Die Membran wird durch das Ersatzschaltbild repräsentiert.

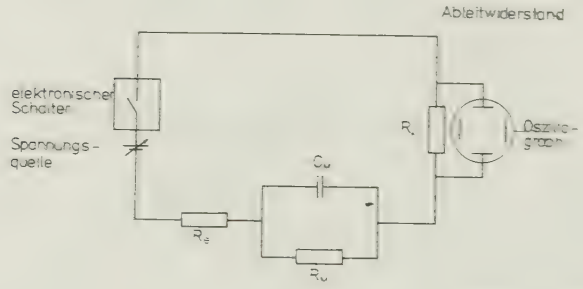


Fig. 16 Meßanordnung für Einschaltexperimente an Membranen

R_K Ableitwiderstand R_M Membranwiderstand
R_e Elektrolytwiderstand C_M Membrankapazität

Für den Stromzeitverlauf erwarten wir zunächst den Aufladestrom, der durch die Membrankapazität C_M hervorgerufen wird, und in seinem zeitlichen Verlauf durch eine RC-Zeit τ bestimmt wird. Der Vorschaltwiderstand R_V setzt sich aus dem Elektrolytwiderstand R_e und dem Ableitwiderstand R_K zusammen. Der Innenwiderstand R_i der Batterie der Spannungsquelle kann vernachlässigt werden, da er nur einige Ohm beträgt. Bei einer Ionenstärke von 10^{-1} M KCl, wie wir sie in fast allen Experimenten verwenden, liegt der Elektrolytwiderstand R_e bei 100 Ω . Als Ableitwiderstand R_K wählen wir 100 Ω .

In unseren Experimenten ist immer erfüllt, daß $R_e + R_K = R_V \ll R_M$, d.h. es ergibt sich eine RC-Zeit:

$$\tau = R_M C_M \frac{R_V}{R_V + R_M} \approx R_V C_M$$

Bei einer Membranfläche von ca 0,1 cm^2 haben wir etwa eine Membrankapazität C_M = 40 nF; für R_V können wir etwa 200 Ω annehmen. Daraus resultiert eine RC-Zeit τ von ca 8 μsec. In unserem Fall ist es nötig ca 10 τ zu warten, um die beobachteten Relaxationen auf einige Prozent genau bestimmen zu können.

Extrapoliert man den Stromzeitverlauf auf die Einschaltzeit t=0, so erhalten wir einen Wert für den Strom $I_{t=0}$, der den Strom ohne Diffusionspolarisation und eventuelle membraninnere Relaxationen wiedergibt. Um sicherzustellen, daß die beobachteten Relaxationen nicht durch die Meßanordnung selbst hervorgerufen werden, wurde in einem Kontrollversuch das Ersatzschaltbild der Membran in Serie zur Meßzelle (ohne Membran) geschaltet.

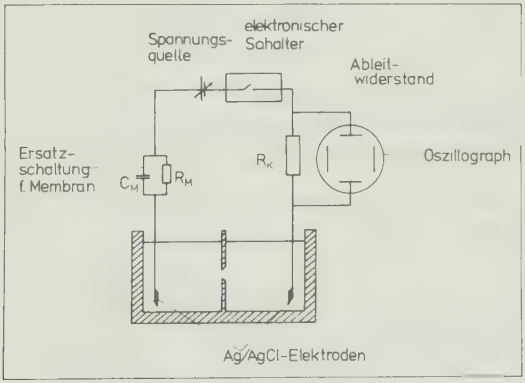


Fig.17 Meßanordnung zur Messung des Einschaltstromes am Ersatzschaltbild der Membran in Serie zur Meßzelle (ohne Membran)

Wir erwarten für den Stromzeitverlauf, daß nach Abklingen des Aufladestromes, hervorgerufen durch die Membrankapazität, sich ein konstanter Strom einstellt, d.h. daß an den bei den Einschaltexperimenten verwendeten Silber-Silberchloridelektroden keine Polarisation auftritt.

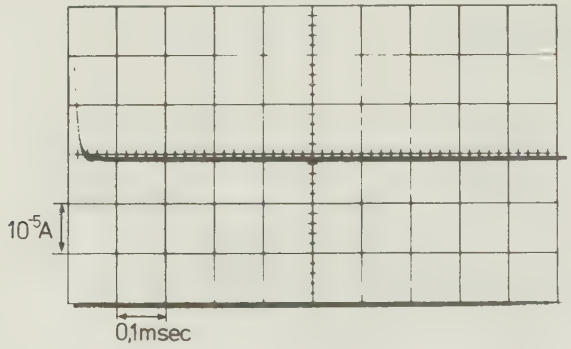


Fig. 18 Oszillogramm des Einschaltstromes an der Ersatzschaltung
R_K = 100Ω ; U = 33 mV; Verstärkung 1 mV/cm

Das Signal für den Strom-Zeit-Verlauf wurde auf einen Speicheroszillographen vom Typ Tektronix 549/1 A 7/a gegeben. Das auf dem Bildschirm gespeicherte Bild wurde mit einer Polaroidkamera nach jedem Experiment aufgenommen.

D Experimente und Resultate

I. Material und Methoden

a) Ausgangsmaterial

Als Lipide wurden Dioleoyllecithin und Phosphatidylinositol verwendet.

Dioleoyllecithin wurde nach der Methode von Robles[14] hergestellt und säulenchromatographisch gereinigt.

Phosphatidylinositol wurde von der Firma Sigma als chromatographisch reines Produkt bezogen.

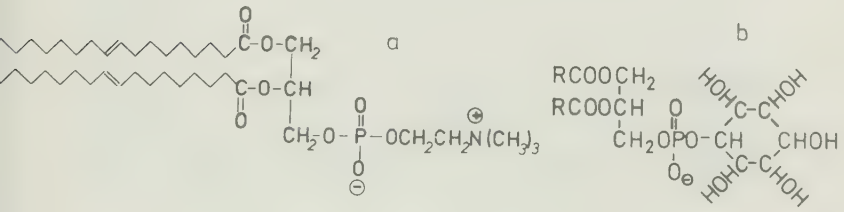


Fig. 19 Strukturformeln von Dioleoyllecithin (a) und Phosphatidylinositol (b)

Aus Fig. 19 ist zu sehen, daß Dioleoyllecithin ein neutrales Molekül ist, während Phosphatidylinositol eine negative Ladung besitzt.

Es wurden folgende Entkopplersubstanzen, die der Elektrolytphase zugesetzt wurden, verwendet:

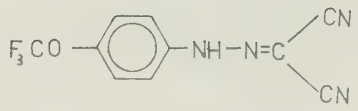
1. Pikrinsäure
   Pikrinsäure ist wie alle anderen verwendeten Entkoppler eine schwache organische Säure. Der pK_a-Wert beträgt 2,0. Das Molekulargewicht (M.G.) beträgt 229,11 g.

Pikrinsäure wurde von der Firma Fluka bezogen.

2. 2,4 Dinitrophenol (2,4 DNP)
Dinitrophenol hat einen pK_a von 4.08 und ein Molekulargewicht von 184.11 g. Die Substanz wurde von der Firma Fluka bezogen.

3. Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazon (FCCP)

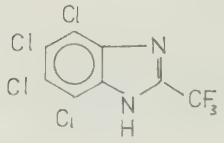
M.G. = 254.2 g
pK_a = -.



FCCP wurde von Dr. Heytler von der Firma Du Pont de Nemours & Co. (Inc.) bezogen.

4. Tetrachloro-2- trifluoromethylbenzimidazol (TTFB)

M.G. = 303.1 g
pK_a = 5.04



TTFB wurde von Dr. Burton vom Chesterford Park Research Station, Fison Pest Control, Ltd. Safron Walden, Essex zur Verfügung gestellt.

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

b) Methoden zur Herstellung von bimolekularen Lipidmembranen

Das Lipid, in unserem Fall das Dioleoyllecithin wird in einer 1 %igen alkoholischen (Äthanol) Stammlösung unter Stickstoff bei ca -22° C aufbewahrt. Der Stammlösung wird eine Probe von ca 0.3 ml entnommen und am Rotationsverdampfer eingedampft. Danach gibt man in den Rest 0.6 ml n-Decan, so daß eine 0.5 %ige Lösung erhalten wird. Ein Tropfen der Lecithin-Decanlösung wird auf eine mit einem Teflonschlauch überzogene Drahtschleife gegeben. In die mit Elektrolyt gefüllte Teflonküvette wird die Lecithinlösung mit der Drahtschleife auf die Öffnung in der Zwischerwand der Teflonküvette gebracht und verschmiert, bis sich eine Lamelle bildet. Diese wird mit einer Richtlampe beleuchtet und mittels eines Fernrohrs beobachtet.

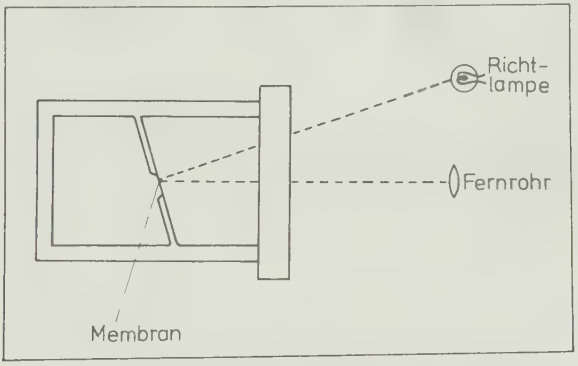


Fig. 20 Anordnung zur Beobachtung der Membran

Zunächst zeigt die Lamelle Interferenzfarben, die auf eine Dicke von einigen Microns (μ) hinweisen. Nach einigen Minuten verschwinden die Farben und eine scharf abgegrenzte, einheitlich schwach reflektierende Fläche bildet sich aus. Diese wurde mit Hilfe von Dickenmessungen als bimolekulare Membran identifiziert (Kapazitäts- und optische Dickenmessungen[10]). Fig. 21 zeigt die Ausbildung einer bimolekularen Lipidmembran. Alle folgenden Versuche wurden bei einer Temperatur von 25°C ausgeführt.

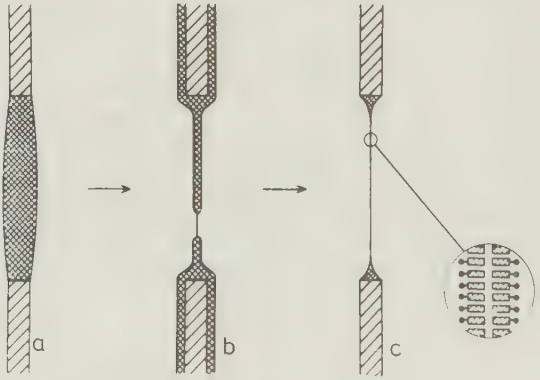


Fig. 21 Ausbildung einer bimolekularen Lipidmembran
a. Lamellare Phase
b. Beginn der Ausbildung der bimolekularen Membran
c. Ausgebildete bimolekulare Membran

II. Untersuchung von Stromspannungskurven von Lipidmembranen in Gegenwart verschiedener Entkopplersubstanzen

a) Vorversuche und Allgemeines über Stromspannungscharakteristiken von Lipidmembranen

Bimolekulare Lipidmembranen verhalten sich bei angelegten Spannungen von ca 20 - 40 mV je nach der Außenphase, in der sie sich befinden, in etwa wie ohm'sche Widerstände. Bei höheren Spannungen gehen die Stromspannungscharakteristiken in einen stark nichtlinearen Bereich über. Es ist naheliegend, daß man den experimentell leicht zugänglichen nichtlinearen Bereich von Stromspannungscharakteristiken untersucht und theoretisch zu deuten sucht, um möglicherweise Aufschluß über die Art des Ionentransports durch die Membranen zu bekommen.

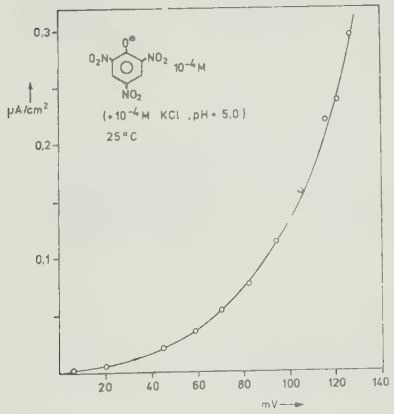


Fig. 22 Stromspannungskurve einer Lecithinmembran in Gegenwart von
10^{-4} M KCl
10^{-4} M Pikrinsäure
pH = 5.0

Zunächst wurden einige Vorversuche gemacht.

1. Es wurde die Leitfähigkeit einer Membran in Abwesenheit von Entkopplern in einer 10^{-1} M Kcl-Lösung bestimmt. Bei einer Spannung von 20 mV erhalten wir eine Leitfähigkeit von ca. $10^{-8} \Omega^{-1}$ cm^{-2}.

2. Um an einer Membran die Beeinflussung der Leitfähigkeit durch Entkoppler deutlich zu machen, wurden im Fall von 2,4 Dinitrophenol und Pikrinsäure Austauschversuche durchgeführt. Es wurde eine Membran in einer 10^{-1}M Na-Azetatpufferlösung (pH = 6.0) hergestellt und ihre Leitfähigkeit in diesem Medium bestimmt; anschließend wurde mit Hilfe der Austauschapparatur Pikrinsäure, bzw. 2,4 Dinitrophenol-Lösung gegen die Na-Azetatlösung ausgetauscht. Die Membranleitfähigkeit in Gegenwart der beiden Entkoppler wurde jeweils bestimmt. Danach wurde die jeweilige Lösung wieder gegen eine 10^{-1}M Na-Azetatlösung ausgetauscht und abschließend wiederum die Leitfähigkeit der Membran in der Na-Azetatlösung bestimmt. Die Spannung, die angelegt wurde, um die Leitfähigkeit zu bestimmen, betrug 20 mV.

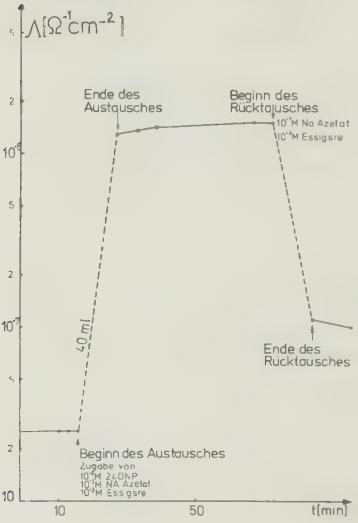


Fig. 23 Einfluß von 2,4 Dinitrophenol auf die Leitfähigkeit einer Membran

Für Pikrinsäure finden wir eine Leitfähigkeitserhöhung der Membran auf $\Lambda \cdot 10^{-6}\ \Omega^{-1}\ cm^{-2}$. Die Lösung, in der sich die Membran befand, bestand aus 10^{-4} M Pikrinsäure und 10^{-1} M 1:1 Azetatpuffer. Aus Fig. 23 ist zu sehen, daß nach dem Rücktausch, d.h. wenn wieder auf beiden Seiten der Membran sich die Lösung ohne 2,4 DNP befindet, die Leitfähigkeit nicht auf den Wert absinkt, der am Anfang des Experiments gemessen wurde. Dies läßt sich damit erklären, daß in der Membran nach dem Rücktausch noch einige lipidlösliche Ionen sich befinden und damit noch eine spürbare Leitfähigkeitserhöhung ausmachen. Ferner beobachtet man, daß die Leitfähigkeit von Membranen mit der Zeit innerhalb von 1^h etwa je nach System bis zu einem Faktor 2 zunehmen kann. In unserem Fall wurde die Membranleitfähigkeit über 50 min lang beobachtet, so daß der Zeiteffekt auch einen Beitrag zur Anhebung der Leitfähigkeit nach dem Rücktausch liefern kann.

Um den Einfluß des Lipides auf die Leitfähigkeit zu testen, wurde in Gegenwart von Pikrat die Leitfähigkeit von Phosphatidylinositolmembranen, von denen wir wissen, daß sie negativ geladen sind, im Vergleich zu neutralen Lipidmembranen bestimmt. Als Parameter wurde die Gesamtionenstärke variiert.

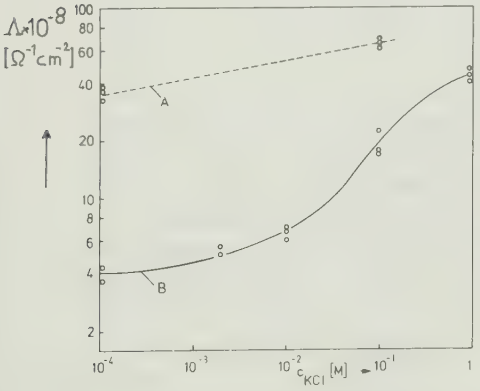


Fig.24 Einfluß der Ionenstärke auf die Leitfähigkeit von Membranen bei 10^{-4} M Pikrinsre. und pH = 5.0
a. neutrale Lecithinmembran
b. geladene Phosphatidylinositolmembran

Aus Fig. 24 ist zu sehen, daß die Leitfähigkeit von negativ geladenen Membranen für negative Ladungsträger bei kleinen Ionenstärken kleiner ist als die von Membranen aus neutralen Lipiden[18]. Analog nimmt die Leitfähigkeit einer negativ geladenen Membran gegenüber positiv geladenen Ladungsträgern zu. Dieses Phänomen kann folgendermaßen erklärt werden; durch die geladene Oberfläche einer Membran bekommen wir im spannungslosen Zustand eine Potentialdifferenz zwischen Elektrolytphase und Membran; das hat zur Folge, daß je nach Vorzeichen der geladenen Oberfläche der Membran sich mehr positive bzw. negative Ionen in der Membran aufhalten, als sie sich in einer Membran mit neutraler Oberfläche aufhalten können. Mit zunehmender Ionenstärke nimmt bei gegebener Oberflächenladung das Oberflächenpotential ab und der Effekt verschwindet. Es ist also nötig, da z.T. bei den folgenden Versuchen die Gesamtionenstärke um einige Größenordnungen variiert wurde, ein neutrales, einheitliches Lipid, wie in unserem Fall das Dioleoyllecithin, zu verwenden.

b) Untersuchungen zum Ioneninjektionsmechanismus und zum Spiegelladungsmodell

1. Ioneninjektionsmechanismus[19]

Grundlage für den Ioneninjektionsmechanismus an bimolekularen Lipidmembranen ist folgende physikalische Betrachtung.

Im spannungslosen Zustand steht die Membran im Gleichgewicht mit der wässrigen Phase, d.h. die Ionen sind entsprechend dem Verteilungskoeffizienten in wässriger und Membranphase verteilt. Legt man eine Spannung an, so fällt die Spannung nicht nur in der Membran, sondern je nach Gesamtionenstärke des Elektrolyten auch in der wässrigen Grenz-

schicht der Membran ab. Dadurch erhält man in der Nähe der Membran eine Anhäufung bzw. Verarmung an lipidlöslichen Ionen. Mit zunehmender Spannung dringen gemäß einer Boltzmannverteilung mehr Ionen auf der einen Seite in die Membran ein als sie sie auf der anderen Seite verlassen können. Dadurch wird die Ionenkonzentration in der Membran erhöht, was zur Folge hat, daß der Strom stärker zunimmt als die Spannung. Die Theorie sagt explizit aus, daß ab Ionenstärken kleiner 10^{-3} M eine deutliche Nichtlinearität der Stromspannungscharacteristik zu erwarten ist.

Um die Theorie zu testen, wurden bei kleinen und bei großen Ionenstärken bei gleichbleibendem pH und konstanter Entkopplerkonzentration Stromspannungskurven aufgenommen und die Nichtlinearitäten gegen die Spannung aufgetragen.

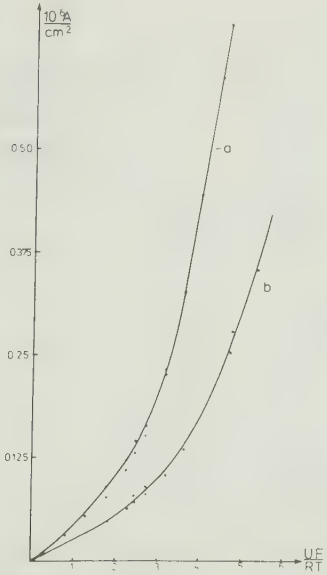


Fig. 25 Stromspannungskurven in Gegenwart von

a 10^{-4} M 2,4 DNP
10^{-1} M KCl

b 10^{-4} M 2,4 DNP
10^{-4} M KCl

pH für beide Lösungen 4,27

U = angelegte Spannung
F = Faradaykonst.
R = allg.Gaskonst.
T = Temperatur

Aus diesen Kurven ermittelt man die Nichtlinearität, indem man den linearen Teil der Stromspannungskurven zu höheren Spannungen bis etwa 120 mV extrapoliert. Damit erhalten wir einen linearen Anteil des Stromes, den wir mit I_1 bezeichnen und analog dazu einen konstanten Anteil der Leitfähigkeit Λ_o. Λ_o wird folgendermaßen definiert

$$\Lambda_o = \left(\frac{I}{u}\right)_{u \approx 0} = \text{konstant},$$

während die Leitfähigkeit, die spannungsabhängig ist, wie folgt definiert wird

$$\Lambda = \left(\frac{I}{u}\right)$$

Trägt man das Verhältnis von Λ/Λ_o gegen die Spannung auf, so erhält man ein Maß für die Nichtlinearität von Stromspannungscharakteristiken.

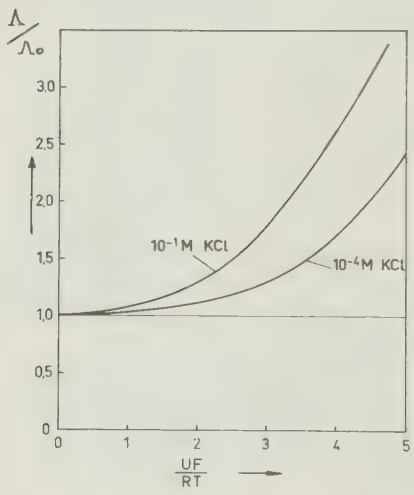


Fig.26 Darstellung der Nichtlinearitäten von Stromspannungskurven in Gegenwart von 10^{-4}M 2,4 DNP bei zwei verschiedenen Gesamtionenstärken

Aus Fig. 26 ist zu sehen, daß bei hohen Ionenstärken die Nichtlinearität ausgeprägter ist als bei kleinen Ionenstärken, ein Ergebnis, das gerade im Gegensatz dazu steht, was die Injektionstheorie voraussagt. Wir folgern daraus, daß der Effekt des Spannungsabfalls in der Elektrolytphase bei den in unseren Experimenten verwendeten Ionenstärken viel zu klein ist, um einen meßbaren Beitrag zu der Nichtlinearität zu bringen, und daß dieser Effekt von anderen Beiträgen, die wir im Folgenden behandeln, überlagert wird.

2. Das Spiegelladungsmodell [20]

Bei der Betrachtung des Spiegelladungsmodells geht man davon aus, daß Membran und Elektrolytlösung zwei Phasen mit völlig verschiedenen Dielektrizitätskonstanten darstellen.

ε ist gleich 80 für die wässrige Phase und gleich 2 für die Membranphase.

Auf Grund der Betrachtung von Born [21] erwarten wir für ein Ion, das von dem Milieu mit hoher Dielektrizitätskonstante in ein Milieu mit niedriger Dielektrizitätskonstante übertreten soll, eine auf Grund von elektrostatischer Wechselwirkung hervorgerufene Energiebarriere.

Born fand für makroskopische Phasen folgende Beziehung, die die Höhe der Energiebarriere beschreibt

$$(1) \qquad \Delta E = \frac{q_0}{r} \left(\frac{1}{\varepsilon_2} - \frac{1}{\varepsilon_1} \right)$$

Setzen wir etwa r = 5 Å,
dann finden wir für

$\Delta E = 28{,}5\ kT$

In unserem Fall ist

ε_1 = Dielektrizitätskonstante des Wassers = 80

ε_2 = " der Membran = 2

$a_0 = \frac{e_0^2}{2kT} = 285$ Å

k = Boltzmannkonstante

T = Absolute Temperatur

e_0 = Elementarladung

r = Radius des Ions

E = Energie in kT

Für die Membran erhalten wir folgendes Potentialprofil

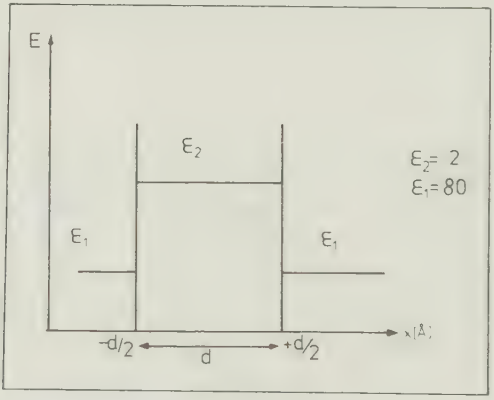


Fig. 27 Potentialprofil für Ionen nach der Born'schen Betrachtung

ε_1 Dielektrizitätskonstante des Wassers
ε_2 Dielektrizitätskonstante der Membran
d Dicke der Membran in Å
E Energie in kT

Bei den sehr dünnen Lipidmembranen haben wir aber zusätzlich Spiegelbildkräfte zu berücksichtigen, die zu einer Abflachung des rechteckigen Potentialprofils führen.

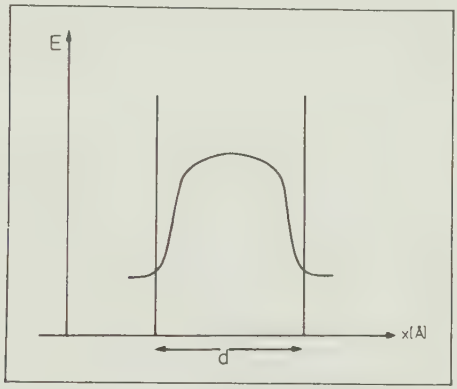


Fig. 28 Potentialprofil in einer Membran unter Berücksichtigung von Spiegelbildkräften
E Potentielle Energie
d Dicke der Membran

Wird eine Spannung an die Membran gelegt, so wird bei geringen Ionenkonzentrationen in der Membran dem in Fig.28 dargestellten Potenialprofil ein konstantes elektrisches Feld (constant field approximation) überlagert.

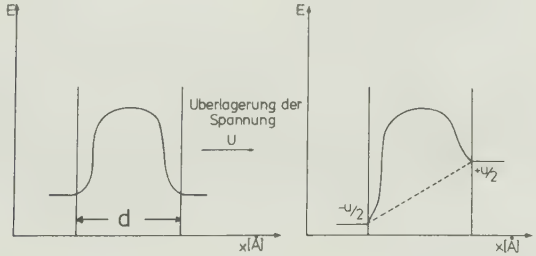


Fig. 29 Constant field approximation in einer Membran
U angelegte Spannung
d Dicke der Membran

Die Berechnung des Ionenstroms mit Hilfe der Nernst-Planck-Gleichung unter Berücksichtigung des durch die Spiegelbildkräfte modifizierten Potentialprofils ergibt eine schwache Nichtlinearität von Stromspannungskurven, die mit folgenden Versuchen getestet wurde:

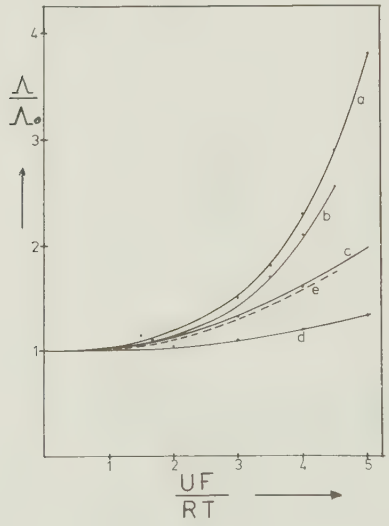


Fig. 30 Nichtlinearitäten von Stromspannungskurven in Gegenwart von

a 10^{-3} M 2,4 DNP pH = 4.42 Λ = 8.7 10^{-6} Ω^{-1} cm^{-2}
b 10^{-3} M Pikrinsre. pH = 4.8 Λ = 7.2 10^{-7} " "
c 10^{-6} M FCCP pH = 6.1 Λ = 2.8 10^{-6} "
d 10^{-5} M TTFB pH = 3.0 Λ = 6.0 10^{-4} "
e Theoretische Kurve aus dem Spiegelladungsmodell unter Verwendung von ε_m = 2.0 und d = 50 Å
Λ Leitfähigkeit bei 20 mV gemessen

Fig. 30 zeigt die Nichtlinearitäten von Stromspannungscharakteristiken von Membranen, die in Gegenwart von 2,4 DNP, Pikrinsäure, FCCP und TTFB aufgenommen wurden. Im Falle des FCCP erhalten wir etwa eine Übereinstimmung mit dem Spiegelladungsmodell. Die Kurve in Gegenwart von TTFB liegt in ihrer Nichtlinearität unter den Werten des Modells; die anderen Kurven liegen sehr stark über den Ergebnissen, die das Spiegelladungsmodell liefert.

Eine Erklärung für die zum Teil extrem starken Nichtlinearitäten könnte der Felddissoziations- oder "Wien"-effekt bringen. Wir wissen, daß bei hohen Feldstärken von 5 - 50 kV/cm schwache Elektrolyte in ihren Stromspannungscharakteristiken starke Nichtlinearitäten aufweisen, die daher rühren, daß infolge des großen elektrischen Feldes Ionenpaare vermehrt dissoziieren und somit mehr Ladungen erzeugt werden. Ähnliche Feldstärken erreicht man auch in Lipidmembranen[22], wenn z.B. 100 mV angelegt werden.

$$(2) \qquad E = \frac{U}{d} = \frac{100 \cdot 10^{-3}}{50 \cdot 10^{-8}} = 2 \cdot 10^{5} \text{ V/cm}$$

E = Feldstärke in V/cm
U = angelegte Spannung in V
d = Dicke der Membran in cm

Experimente mit Relaxations messungen, mit denen der "Wien"-effekt nachgewiesen werden sollte, haben bisher noch keine eindeutigen Ergebnisse gezeigt.

c) Zusammenfassung der Untersuchungen von Stromspannungscharakteristiken von Lipidmembranen

Die im vorhergehenden Kapitel vorgestellten Arbeiten über die Nichtlinearität von Stromspannungscharakteristiken können keine zuverlässige Theorie über den Mechanismus, dem die Nichtlinearität zu Grunde liegt, geben. Man kann jedoch sagen, daß für den einfachen Ionentransportmechanismus die experimentelle Nichtlinearität mindestens so groß sein muß, wie sie in der Spiegelladungstheorie vorausgesagt wird. Im Fall der Nichtlinearität der Stromspannungskurve in Gegenwart von TTFB bei $pH < pk_a$ (Fig.30). die unter den theoretischen Werten, die das Spiegelladungsmodell liefert, liegt, muß ein komplizierterer Transportmechanismus angenommen werden. Leider haben wir keine Möglichkeiten durch Änderung des Systems, wie die Konzentration des Entkopplers oder pH oder Ionenstärke das Modell zu testen. Die einzigen variierbaren Parameter des Modells neben Strom und Spannung sind die Dielektrizitätskonstante und die Membrandicke. Auf Grund der Meßgenauigkeit z.B der Bestimmung der Fläche des bimolekularen Films sind wir nicht in der Lage, eventuelle Änderungen der Dielektrizitätskonstante bis auf ca 10 % genau zu bestimmen.

Das Phänomen der Nichtlinearität kann bis jetzt nicht allein zur Aufklärung des Ionentransports durch bimolekulare Lipidmembranen herangezogen werden. Im Folgenden wird die Leitfähigkeit von Lipidmembranen im linearen Bereich von Stromspannungskurven untersucht und Modelle diskutiert, von denen die einen als Kontinuumsmodelle angesprochen werden können, und die anderen auf molekularer Ebene basieren.

III. Stationäre Leitfähigkeitsmessungen im linearen Bereich der Stromspannungscharakteristik und Potentialmessungen

a) Diskussion der vorhandenen Modelle zur Erklärung des Ionentransports

Seit längerem ist bekannt, daß die Leitfähigkeit von Membranen in Gegenwart von Entkopplern, die als schwache organische Säuren zu charakterisieren sind, vom pH der Elektrolytlösung abhängt.[15, 23] Die Leitfähigkeit erreicht ein Maximum, wenn das pH etwa gleich dem pk_a des Entkopplers ist. Auf Grund dieser Tatsache formulierten Markin[14] et al. ein Protonencarriermodell, das auf der Nernst-Planck-Gleichung basiert, um den Ionentransportmechanismus zu erklären.

Das Modell beschreibt ein Leitfähigkeitsmaximum in Abhängigkeit vom pH der Elektrolytlösung, wenn eine bestimmte Kombination von Geschwindigkeitskonstanten und Diffusionskoeffizienten, die experimentell nicht zugänglich sind, einen bestimmten Wert annimmt. Außerdem fordert das Modell, das als reines Diffusionsmodell bezeichnet werden kann, eine lineare Beziehung zwischen Leitfähigkeit und Konzentration des Entkopplers über alle pH-Bereiche.

Ein weiteres Modell wurde von Lea und Croghan[25] entwickelt. Dieses Modell postuliert in der wässrigen Phase einen HA_2^--Komplex, wobei H^+ das Proton und A^- das Anion des Entkopplers bedeutet. Auch dieses Modell liefert das pH-Maximum der Leitfähigkeit in Nähe des pk_a-Wertes des Entkopplers. Die Leitfähigkeit hängt über alle pH-Bereiche quadratisch von der Konzentration des Entkopplers ab.

Beide Modelle können, wie später gezeigt wird, auf Grund ihrer Aussage über die Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit ausgeschlossen werden.

Als letztes Modell sei das Modell von Bruner[26] erwähnt, und etwas näher erläutert. Bruner nimmt Bindungsstellen (Binding sites) in den Membrangrenzflächen an, die die membranlöslichen Entkoppler in dissoziierter und undissoziierter Form besetzen können.

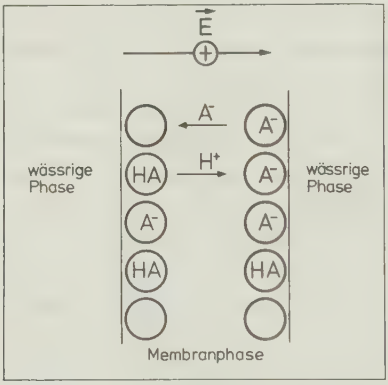


Fig. 31 Modellansatz zum Bindungsstellenmodell von Bruner

E elektrisches Feld

HA , A^-, Bindungsstellen

HA neutrales Entkopplermolekül

A^- Anion des Entkopplers

Bei Anlegen eines elektrischen Feldes an die Membran sei es möglich, daß ein Proton in Form eines H_3O^+-Ions- die Membran enthält ca 10^{-3} M H_2O[37]- von der einen Seite von einer HA-Bindungsstelle in eine A^--Bindungsstelle auf der anderen Seite der Membran springen kann, während aus einer A^--Bindungsstelle ein Anion in eine leere Bindungsstelle hüpfen kann.

Bei kleinen Entkopplerkonzentrationen,bei denen die freien Bindungsstellen gegeüber den besetzten Bindungsstellen in der Mehrzahl sind,werden für den Protonentransport bzw. für den Anionentransport zwei verschiedene Abhängigkeiten zwischen Leitfähigkeit und Konzentration des Entkopplers gefunden.Die Leitfähigkeit bei $pH > pK_a$,die in diesem Fall durch den Anionentransport getragen wird,hängt linear von der Konzentration C des Entkopplers ab ($\Lambda \sim C$).Bei $pH < pK_a$, wo der Protonenmechanismus vorherrscht, ergibt das Modell eine quadratische Beziehung zwischen Leitfähigkeit und Konzentration des Entkopplers ($\Lambda \sim C^2$). Die quadratische Abhängigkeit zwischen Λ und C für den Protonenmechanismus resultiert daraus, daß man, um ein Proton von der einen Seite auf die andere Seite der Membran zu bewegen, sowohl ein Anion auf der einen Seite, als auch ein HA-Molekül auf der anderen Seite in einer Bindungsstelle benötigt; d.h. man muß die Besetzungswahrscheinlichkeiten für die Bindungsstellen der beiden Moleküle miteinander multiplizieren, was zu einer quadratischen Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Konzentration des Entkopplers führt.

Für hohe Entkopplerkonzentrationen, wenn viele Bindungsstellen besetzt sind, liefert das Modell Sättigungseffekte, d.h. für den Protonentransport wird eine nicht mehr quadratische Beziehung zwischen Λ und C erwartet, während für den Anionentransport die lineare Beziehung zwischen Λ und C in eine Sättigungscharakteristik übergeht.

Das von Bruner gerechnete Modell ist eine Theorie für stationär gemessene Ströme, d.h. für Ströme, die nach 10 - 25 sec gemessen wurden. Um die Rechnung den Meßresultaten anpassen zu können, muß Bruner Experimenten unzugängliche Parameter abschätzen. Außerdem kann bei

Betrachtung des stationären Falls der Anionen- und Protonentransport nur einzeln behandelt werden, während experimentell die beiden Mechanismen sich nicht trennen lassen.

b) Stationäre Leitfähigkeitsmessungen in Gegenwart von Pikrinsäure und 2,4 Dinitrophenol und Potentialmessungen in Gegenwart von Pikrinsäure

Einen Hinweis, daß das Modell von Bruner experimentell bestätigt werden kann, liefern die Sättigungseffekte, die in Gegenwart von Pikrinsäure gemessen wurden.

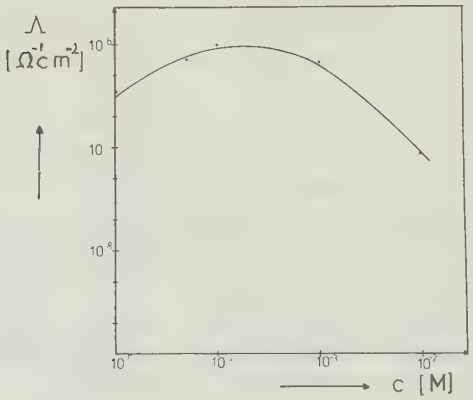


Fig. 32 Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Konzentration der Pikrinsäure
Die Lösungen enthielten neben der Pikrinsäure
10^{-1} M KCl
10^{-1} M 1 : 1 K-Azetatpuffer
pH = 4.50

Fig. 32 zeigt ein Leitfähigkeitsmaximum in Abhängigkeit von der Konzentration der Pikrinsäure. Der pH-Wert ist so gewählt, daß die Pikrinsäure völlig dissoziiert vorliegt, und somit nur der Transport von A^--Ionen betrachtet werden kann. Bei hohen Pikratkonzentrationen, wie in Fig. 32 zu sehen ist, beobachten wir eine Abnahme der Leitfähigkeit, d.h. es sind immer mehr Bindungsstellen mit Anionen beidseitig besetzt, so daß der Ionentransport blockiert wird. Wenn im Extremfall alle Bindungsstellen besetzt sind, müßte der Anionentransport und damit die Leitfähigkeit gegen Null gehen.

Daß bei pH = 4.50, bei dem die Konzentrationsabhängigkeit aufgenommen wurde, ein Anionentransport vorliegt, wurde durch die Messung des Konzentrationspotentials festgestellt.

Zunächst wurde in einer 10^{-3} M Pikratlösung eine Membran aufgezogen. Nach Ausbildung des bimolekularen Films wurde mit Hilfe der Austauschapparatur die Lösung in dem erdfreien Kompartiment der Küvette, in der sich die Meßelektrode befand, gegen eine 10^{-2} M Pikratlösung ausgewechselt. Während des Austausches war die Membran über den Schalter S kurzgeschlossen.

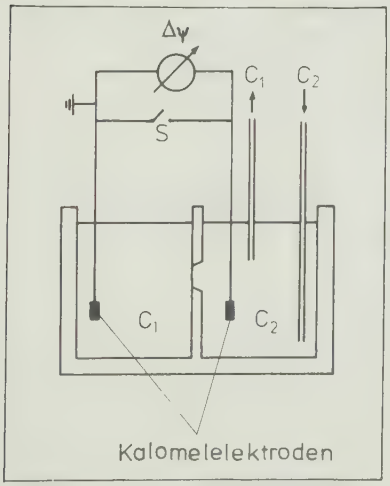


Fig. 33 Anordnung zur Messung des Konzentrationspotentials
S Schalter, um die Membran kurzzuschließen
C_1 10^{-3} Pikrinsäure
$0.5\ 10^{-1}$ M Na-Azetat
$0.5\ 10^{-1}$ M Essigsäure
C_2 10^{-2} M Pikrinsäure
$0.5\ 10^{-1}$ M Na-Azetat
$0.5\ 10^{-1}$ M Essigsäure
pH für beide Lösungen ca. 4.5

Als Voltmeter wurde in diesem Versuch ein Elektrometer der Fa. Knick verwendet um die Spannungsdifferenz zu messen.

Nach der Nernst'schen Beziehung erwarten wir ein Potential

$$(3) \qquad \Delta\psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_1}{c_2} = 58\,mV$$

Gemessen wurde ein Potential von+50 mV in der in Fig.33 angezeigten Meßanordnung; d.h. die Membran ist anionenpermeabel.

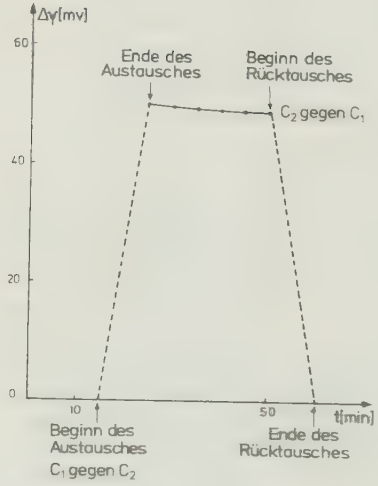


Fig.34 Zeitlicher Verlauf des Konzentrationspotentials über einer Membran in Gegenwart von Pikrat C_1 ; C_2 siehe Fig.33

In Gegenwart von 2,4 Dinitrophenol wurde die Leitfähigkeit von Membranen bei zwei verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH der Außenlösung gemessen.

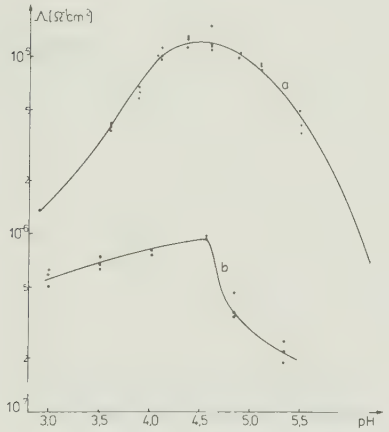


Fig. 35 Abhängigkeit der Leitfähigkeit vom pH bei zwei verschiedenen Konzentrationen von 2,4 DNP

a $C = \frac{10^{-3} \text{ M 2,4 DNP}}{10^{-1} \text{ M KCl}}$

b $C = \frac{7\ 10^{-5} \text{ M 2,4 DNP}}{10^{-1} \text{ M KCl}}$

Die pH-Werte wurden mit KOH bzw. HCl eingestellt, als Elektroden wurden Kalomelelektroden verwendet. Λ wurde bei 20 mV bestimmt.

Stationäre Messungen mit Entkopplersubstanzen zu unternehmen, die die Leitfähigkeit der Membran wesentlich stärker erhöhen und damit es erlauben würden, über größere Konzentrationsbereiche ihren Einfluß auf die Membranleitfähigkeit zu untersuchen, sind aus meßtechnischen Gründen sehr problematisch, wegen der hier auftretenden Diffusionspolarisation. Um die Diffusionspolarisation und andere zeitabhängige Effekte, die im folgenden beschrieben werden sollen, auszuschließen, wurden Einschaltmessungen gemacht, die es erlauben, den Strom I zur Zeit t=0 zu bestimmen.

IV. Untersuchung des Ionentransportmechanismus mit Hilfe von Relaxationsmessungen in Gegenwart von TTFB

a) Modifiziertes Bruner-Modell

1. Physikalische Begründung der Existenz von Bindungsstellen in den Grenzflächen von Membranen

Bruner begründet die Existenz von Bindungsstellen in den Membrangrenzflächen damit, daß die lipophilen Entkoppleranionen mit den polaren Gruppen der Lipide einen Komplex bilden können. Die Lipid-Entkoppler-Komplexbildung kann nur als Ad-hoc-Annahme verstanden werden, da es keinen Hinweis für einen Lipid-Entkoppler-Komplex gibt.

Es ist aber möglich zu zeigen, daß lipophile Anionen aus energetischen Gründen sich in den Grenzflächen aufhalten.[28] In einem der vorigen Kapitel wurde das Spiegelladungsmodell vorgestellt, in dem auf Grund der Born'schen Energie und der Spiegelladung für ein Ion ein bestimmtes Potentialprofil besteht, das auf elektrostatischer Wechselwirkung beruht. Für Ionen, die zu Gunsten der Membran einen hohen Verteilungskoeffizienten besitzen, und die damit als hydrophobe Ionen bezeichnet werden können, kann man auf Grund der hydrophoben Wechselwirkung einen negativen Potentialtopf annehmen. Dieser wird dem Spiegelladungsprofil überlagert, so daß wir an den Grenzflächen Potentialminima erhalten, die einen Aufenthalt von Ionen in der Membran an der Grenzfläche wahrscheinlich machen.

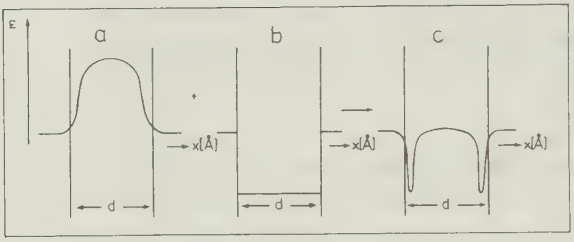


Fig. 36 Überlagerung des Spiegelladungsprofils (a) mit dem Profil, das durch die hydrophobe Wechselwirkung (b) hervorgerufen wird
c Potentialprofil, das aus a und b resultiert
E potentielle Energie
d Dicke der Membran

Aus Fig. 36 ist zu sehen, daß Anionen sich bevorzugt in der Grenzfläche der Membran aufhalten können. Das Bruner-Modell fordert ferner, daß HA-Moleküle in der Grenzfläche vorhanden sein müssen. Dies läßt sich damit begründen, daß HA-Moleküle ein Dipolmoment haben, auf Grund dessen sie sich lieber in der weniger apolaren Membrangrenzfläche aufhalten.

2. Berechnung des Einschaltstromes $I_{t=0}$ (I_0) mit Hilfe des modifizierten Bruner-Modells

2.1 Modifizierung des Modells

Die Modifizierung des Modells besteht darin, daß im Gegensatz zu der Rechnung von Bruner, die den stationären Strom beschreibt, Ströme zur Zeit t=0 beschrieben werden sollen. Dies hat den Vorteil, daß so der Anionen- und der Protonentransport gleichzeitig, wie sie auch experimentell nachgewiesen werden, berechnet werden können, während

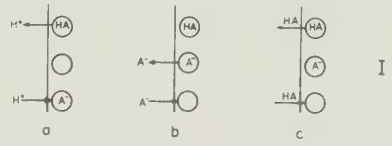
im Modell von Bruner jeweils der Anionen- und Protonentransport nur einzeln berechnet werden kann; d.h. jeweils ein Mechanismus muß bei der Rechnung Null gesetzt werden.

2.2 Transportmechanismen

Für Entkoppler, in unserem Fall das TTFB, gilt das Gleichgewicht in wässriger Lösung

$$[HA] \rightleftharpoons [A^-] + [H^+]$$

Wir können folgende Transportmechanismen formulieren an den Membrangrenzflächen und in der Membran.



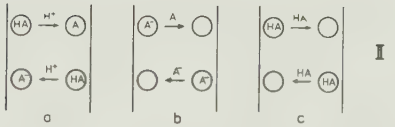


Fig. 37 Transportmechanismen an den Membrangrenzflächen (I) und in der Membran (II)

Die Bindungsstellenzahl wird als Flächenkonzentration, also in Mol/cm^2 angegeben. Es werden für die Bindungsstellen mit der verschiedenen Besetzung von Molekülen folgende Bezeichnungen eingeführt.

N_S Gesamtkonzentration von Bindungsstellen in Mol/cm^2

N Konzentration an HA-Molekülen pro cm^2 Membranfläche

N_- Konzentration an A^- Ionen pro cm^2 Membranfläche

N_o Konzentration unbesetzter Bindungsstellen in Mol/cm^2

Für die linke Membrangrenzfläche werden die Bindungsstellenkonzentrationen folgendermaßen indiziert
N', N'_-, N'_o
während für die rechte Membrangrenzfläche analog gilt
N'', N''_-, N''_o
es gilt die Nebenbedingung
$N_S = N' + N'_- + N'_o = N'' + N''_- + N''_o$
Die in Fig. 37 dargestellten Transportmechanismen können mit folgenden Transportgleichungen beschrieben werden:

1. Der Protonenfluß über die Grenzflächen.
Wie aus Fig. 37 Bild I a zu sehen ist, läßt sich der Protonenfluß an der linken Grenzfläche der Membran folgendermaßen beschreiben:

Für den Transport von links nach rechts, also von der wässrigen Phase in die Membranphase nehmen wir an, daß der Protonenfluß proportional zur Konzentration $[H^+]$ der Protonen in der wässrigen Phase und zur Konzentration der mit A^-Ionen besetzten Bindungsstellen N'_- in der Membran ist. Der Protonenfluß von rechts nach links, also von der Membranphase in das wässrige Milieu ist proportional zu der Konzentration der mit HA besetzten Bindungsstellen N'.

Wir können den Protonenfluß an der linken Grenzfläche formulieren:

$$(4a) \quad \phi_+' = \beta_+ [H^+] N_-' - \gamma_+ N'$$

analog erhalten wir für die rechte Grenzfläche

$$(4b) \quad \phi_+'' = -\beta_+ [H^+] N_-'' + \gamma_+ N''$$

Der Fluß ϕ_+ hat die Dimension Mol/cm^2 sec
Die Konstante β_+ hat die Dimension cm^3/Mol sec
Die Konstante γ_+ hat die Dimension sec^{-1}

2. Der Anionenfluß über die Grenzflächen ist auf der linken Seite der Membran von links nach rechts proportional der Konzentration der Anionen in der wässrigen Phase und der Konzentration der unbesetzten Bindungsstellen N_0'. Von rechts nach links ist der Fluß der A^-Ionen proportional der mit A^- besetzten Bindungsstellen N_-' . (Fig.37 Ib)

$$(5a) \quad \phi_-' = \beta_- [A^-] N_0' - \gamma_- N_-'$$

(5 a) beschreibt den Fluß über die linke Grenzfläche

$$(5b) \quad \phi_-'' = -\beta_- [A^-] N_0'' + \gamma_- N_-''$$

(5b) beschreibt der Fluß über die rechte Grenzfläche

β_-, γ_- sind analog β_+, γ_+ dimensioniert.

3. Der Fluß über die beiden Grenzflächen für die neutralen HA Moleküle läßt sich analog wie unter 1. und 2. formulieren, (Fig. 37 Ic).

für die linke Grenzfläche gilt

$$(6a) \quad \phi_0' = \beta_0 [HA] N_0' - \gamma_0 N'$$

und für die rechte Grenzfläche

$$(6b) \quad \phi_0'' = -\beta_0 [HA] N_0'' + \gamma_0 N''$$

4. Der Protonenfluß in der Membran von links nach rechts ist proportional der mit HA besetzten Bindungsstellenkonzentration N' und der mit Anionen besetzten Bindungsstellenkonzentration N_-''. Analoges gilt für den Fluß von rechts nach links (Fig.37 IIa).

Wir erhalten folgenden Ausdruck

$$(7) \quad \phi_+ = \frac{k_+'}{N_6} N' N_-'' - \frac{k_+''}{N} N_-' N''$$

Voraussetzung für diese Formulierung ist ein Einzelsprung von der einen Seite der Membran auf die andere Seite.

K'_+, K''_+ sind die Sprungkonstanten für Protonen, die die Dimension sec^{-1} erhalten, indem sie mit dem Faktor $\frac{1}{N_S}$ normiert werden.

Liegt an der Membran eine Spannung U an, so wird die Potentialbarriere um u/2 erhöht bzw. erniedrigt (Fig.29), d.h. es folgt für die Sprungraten K'_+ und K''_+ unter Benützung des Eyring-Formalismus

$$K'_+ = K_+ e^{u/2} \qquad K''_+ = K_+ e^{-u/2}$$

$$u = \frac{U \cdot F}{RT} = \frac{\psi' - \psi''}{RT} F$$

ψ' Potential auf der linken Seite der Membran
ψ'' Potential auf der rechten Seite der Membran

Bei der Überlegung, die den Spannungsabfall in der Membran beschreibt, wurde wieder die constant field approximation eingeführt, wobei der Spannungsabfall im Elektrolyten, wie er beim Ioneninjektionsmechanismus beschrieben wird, zu vernachlässigen ist. Die Wertigkeit z der transportierten Ionen ist im Fall des Protonentransports +1 und im Fall des Anionentransports -1 und braucht in den Gleichungen nicht besonders aufgeführt werden.

Der Protonenfluß ϕ_+ in der Membran läßt sich jetzt schreiben

$$(6) \qquad \phi_+ = \frac{K_+}{N_s} \left\{ e^{u/2} N' N'_- - e^{-u/2} N'' N'_- \right\}$$

5. Analog dem Protonenfluß in der Membran läßt sich der Anionenfluß in der Membran formulieren (Fig.37 IIb)

(9)

$$\phi_- = \frac{K_-}{N_s} \left\{ e^{-u/2} N_-' N_o'' - e^{u/2} N_-'' N_o' \right\}$$

6. Der Fluß der neutralen HA-Moleküle wird durch eine Geschwindigkeitskonstante K_o beschrieben, da infolge der Spannungsunabhängigkeit des HA-Flusses die Konstanten in beiden Richtungen gleich sind (Fig.37 II c). Der HA-Fluß wird geschrieben:

(10)

$$\phi_o = \frac{K_o}{N_s} \left\{ N_o'' N' - N'' N_o' \right\}$$

7. Die Stromdichte $\mathfrak{J}$ durch die Membran ist gegeben durch

(11) $$\mathfrak{J} = F(\phi_+ - \phi_-)$$

F Faradaykonstante

2.3 Berechnung der Bindungsstellenkonzentration im Gleichgewicht

Für die spätere Auswertung des Modells benutzen wir Leitfähigkeiten, die zur Zeit t=0 mit Hilfe von Relaxationsmessungen bestimmt werden. Es ist also erlaubt, in den Bindungsstellen die Gleichgewichtskonzentrationen zur Berechnung des Stromes zu verwenden, da zur Zeit $t < 0$ die Membran sich im spannungslosen Zustand befindet. Im Folgenden werden die Gleichgewichtskonzentrationen der Bindungsstellen berechnet.

Im Gleichgewicht ist es erlaubt das Prinzip der mikroskopischen Reversibilität anzuwenden; d.h. es verschwinden nicht nur die Summen von Flüssen wie in unserem Fall z.B.

$$(12) \quad -\phi_+ + \phi_- \simeq 0$$

sondern es verschwinden auch die Einzelflüsse.

Es gilt also

$$(13) \quad \phi_+' = 0 \longrightarrow \gamma_+ N = \beta_+ [H^+] N_-$$

$$(14) \quad \phi_-' = 0 \longrightarrow \gamma_- N_- = \beta_- [A^-] N_0$$

Wenn wir noch die Nebenbedingung

$$(15) \quad N_S = N + N_- + N_0$$

hinzuziehen, haben wir 3 Bestimmungsgleichungen für die 3 Bindungsstellenkonzentrationen

$$N, N_-, N_0$$

Aus den Gleichungen (13), (14) und (15) geht hervor, daß durch die Anwendung der mikroskopischen Reversibilität die Übertrittskonstanten β_0 und γ_0 zur Bestimmung der Gleichgewichtskonzentrationen nicht mehr herangezogen werden müssen; d.h. die Gleichgewichtskonzentrationen werden unabhängig vom Fluß ϕ_0 der neutralen HA-Moleküle.

In den folgenden Ausdrücken wird die Konzentration $[A^-]$ in der wässrigen Phase durch die Gesamtkonzentration C der Entkopplersubstanz und durch die Konstante aus dem Massenwirkungsgesetz

$$K = \frac{[H^+]\ [A^-]}{[HA]}$$

ausgedrückt, d.h.

$$C = [A^-] + [HA]$$

$$[A^-] = \frac{K \cdot C}{[H^+] + K}$$

Setzt man N_- und N_0 in (13) ein, erhält man für N_0 folgenden Ausdruck

$$(16) \quad \frac{N_0}{N_s} = \frac{\gamma_+ \gamma_- (k + [H^+])}{\rho}$$

wobei

$$(17) \quad \rho = \gamma_+ \gamma_- (k + [H^+]) + \beta_- k c (\gamma_+ + \beta_+ [H^+])$$

für (18) $\frac{N_-}{N_S} = \frac{\gamma_+\beta_- k \cdot c}{\varrho}$

und für $\frac{N}{N_S}$ ergibt sich

(19)

$$\frac{N}{N_S} = \frac{\beta_+\beta_- k c [H^+]}{\varrho}$$

2.4 Berechnung der Leitfähigkeit zur Zeit t=0

Mit Hilfe der Relaxationsmessungen ist es möglich I zur Zeit t=0 zu bestimmen, d.h. wir können zur Berechnung der Leitfähigkeit zur Zeit t=0 (λ_i^0) die Bindungsstellenkonzentrationen im Gleichgewicht benützen.

Aus Gleichung (8):

$$\phi_+ = \frac{K_+}{N_S} N N_- \left(e^{u/2} - e^{-u/2}\right)$$

ergibt sich

(20) $$\phi_+ = 2 \frac{K_+}{N_S} \sinh\left(\frac{u}{2}\right) N N_-$$

Aus Gleichung (9) folgt analog

$$(21) \qquad \phi_- = 2 \frac{K_-}{N_s} N_- N_o \sinh\left(\frac{u}{2}\right)$$

Einsetzen von ϕ_+ und ϕ_- in Gleichung (11)

$$J = F(\phi_+ - \phi_-) = 2F \sinh\left(\frac{u}{2}\right) \frac{N_-}{N_s}\left(K_+ N + K_- N_o\right)$$

Die ohm'sche Leitfähigkeit λ_o zur Zeit t=0 berechnet sich aus

$$(\lambda_o)_{t=0} \equiv \lambda_{oo} = \lim_{u \to 0} \frac{J_o}{u}$$

$$= \lim_{u \to 0} \frac{J_o F}{RT} \cdot \frac{1}{u}$$

U angelegte Spannung

$$u = \frac{U F}{R T}$$

für kleine Spannungen ist $\sinh\left(\frac{u}{2}\right) \approx \frac{u}{2}$

Zur Zeit t=0 setzt sich die Protonen- und Anionenleitfähigkeit additiv zusammen.

$$(22) \qquad \lambda_{oo} = \lambda^{+}_{oo} + \lambda^{-}_{oo}$$

Für die Protonenleitfähigkeit λ^{+}_{oo} erhalten wir folgende Gleichung, wenn man die berechneten Ausdrücke für N, N_-, N_o einsetzt.

(23)

$$\lambda^{+}_{oo} = \frac{F^2}{RT} K_+ \frac{N N_-}{N_s} = \frac{F^2}{RT} N_s K_+ \frac{\beta_+ \beta_- K c [H^+] f_+ \beta_- K c}{\varrho}$$

wird ϱ in die obige Gleichung eingesetzt, erhalten wir

(24)

$$\lambda_{oo}^{+} = \frac{F^2}{RT} K^2 c^2 N_s K_+ \frac{\frac{\gamma_+}{\beta_+}[H^+]}{\left\{\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}\right)\left(\frac{\gamma_-}{\beta_-}\right)\left(k+[H^+]\right) + kc\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}+[H^+]\right)\right\}^2}$$

für λ_{oo}^{-} ergibt sich ganz entsprechend

(25)

$$\lambda_{oo}^{-} = \frac{F^2}{RT} Kc N_s K_- \frac{\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}\right)^2\left(\frac{\gamma_-}{\beta_-}\right)\left(k+[H^+]\right)}{\left\{\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}\right)\left(\frac{\gamma_-}{\beta_-}\right)\left(k+[H^+]\right) + kc\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}+[H^+]\right)\right\}^2}$$

Die Ausdrücke λ_{oo}^{+} für die Protonenleitfähigkeit und λ_{oo}^{-} für die Anionenleitfähigkeit enthalten nur noch die Parameterkombinationen.

$$N_s K_+ \,,\quad N_s K_- \,,\quad \frac{\gamma_+}{\beta_+} \,,\quad \frac{\gamma_-}{\beta_-}$$

2.5 Sättigungseffekte

Aus den Messungen mit Pikrat und TTFB (die Messungen mit TTFB werden im nachfolgenden experimentellen Teil noch ausführlich behandelt werden) ist zu sehen, daß mit steigender Konzentration des Entkopplers sowohl im sauren sowie im basischen Bereich die Leitfähigkeit der Membran in ein Sättigungsgebiet kommt. Dies ist nur so zu verstehen, daß eine begrenzte Anzahl von

lipidlöslichen Molekülen an den Grenzflächen der Membran adsorbiert werden kann.

In unserem Modell sind Sättigungseffekte zu erwarten, wenn das Verhältnis

$$\frac{N_0 \text{ (Anzahl Mol unbesetzter Bindungsstellen)}}{N_S \text{ (Anzahl Mol der gesamten Bindungsstellen)}} \ll 1$$

wird.

Gleichung (16) gibt den Ausdruck $\frac{N_0}{N_S}$ wieder.

(16)

$$\frac{N_0}{N_S} = \frac{\gamma_+ \gamma_- (k + [H^+])}{\varrho} \approx \frac{\gamma_+ \gamma_- (k + [H^+])}{\gamma_+ \gamma_- (k + [H^+]) + \beta_- k c (\gamma_+ + \beta_+ [H^+])}$$

Das Fehlen von Sättigungseffekten ist zu erwarten, wenn

(26) $$\gamma_+ \gamma_- (k + [H^+]) \gg \beta_- k c (\gamma_+ \beta_+ [H^+])$$

ist oder umgeformt

(27) $$\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}\right)\left(\frac{\gamma_-}{\beta_-}\right)(k + [H^+]) \gg Kc \left(\frac{\gamma_+}{\beta_+} + [H^+]\right)$$

oder

(28) $$1 \gg \frac{k c \left(\frac{\gamma_+}{\beta_+} + [H^+]\right)}{\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}\right)\left(\frac{\gamma_-}{\beta_-}\right)(k + [H^+])}$$

Ferner ergibt sich aus Gleichung (27)

$$(29) \qquad C \ll \frac{\gamma_+ \gamma_- (k + [H^+])}{\beta_- K (\gamma_+ + \beta_+ [H^+])}$$

d.h. im sauren Gebiet, wenn $[H^+] \gg K$ und $\beta_+ [H^+] \gg \gamma_+$ ist, dann gilt

$$(30) \qquad C \ll \frac{\gamma_+ \gamma_-}{\beta_+ \beta_- K}$$

In Abwesenheit von Sättigungseffekten erhält man im basischen Gebiet, wenn $K \gg [H^+]$ und $\beta_+ [H^+] \ll \gamma_+$ ist

$$(31) \qquad \frac{\gamma_-}{\beta_-} \gg C$$

Berücksichtigt man das Fehlen von Sättigung mit der Beziehung (27) in den Ausdrücken (24) und (25), so vereinfachen sich die Gleichungen für den Protonentransport

(24a)

$$\left(\lambda_{00}^+\right)_{c \to 0} = \frac{F^2}{RT} K^2 c^2 N_s K_+ \frac{[H^+]}{\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}\right) \left(\frac{\gamma_-}{\beta_-}\right)^2 \left(k + [H^+]\right)^2}$$

und für den Anionentransport

(25a)

$$\left(\lambda^{-}_{oo}\right)_{c\to o} = \frac{F^2}{RT}\; k\, c N_s K_- \frac{1}{\left(\frac{\gamma_-}{\beta_-}\right)\left(k + [H^+]\right)}$$

Die Ergebnisse aus (24a) und (25a) sagen aus, daß bei Fehlen von Sättigungseffekten wir für den Protonentransport eine quadratische Abhängigkeit zwischen $\left(\lambda^{+}_{oo}\right)_{c\to o}$ und c finden und daß für den Anionentransport in unserem Modell eine lineare Beziehung zwischen $\left(\lambda^{-}_{oo}\right)_{c\to o}$ und c besteht.

Die Ausdrücke (24) und (25) können jetzt in folgender Form geschrieben werden:

(24b) $$\lambda^{+}_{oo} = \left(\lambda^{+}_{oo}\right)_{c\to o} \frac{1}{(1+B)^2}$$

(25b) $$\lambda^{-}_{oo} = \left(\lambda^{-}_{oo}\right)_{c\to o} \frac{1}{(1+B)^2}$$

wobei der Parameter B den Einfluß der Sättigung angibt.

$$B = \frac{k\, c \left(\frac{\gamma_+}{\beta_+} + [H^+]\right)}{\left(\frac{\gamma_+}{\beta_+}\right)\left(\frac{\gamma_-}{\beta_-}\right)\left(k + [H^+]\right)}$$

Die vier in die Theorie eingehenden Parameterkombinationen können jetzt so bestimmt werden, daß die theoretischen Kurven den experimentellen Ergebnissen bei zwei verschiedenen pH-Werten bei jeweils zwei verschiedenen Entkopplerkonzentrationen angepaßt werden, wobei die eine Konzentration sehr gering ist, daß man keine Sättigungseffekte zwischen λ^0 und c mißt, während man die andere so hoch wählt, daß man experimentell Sättigungseffekte zwischen λ^0 und c feststellt.

b) Relaxationsmessungen und Resultate in Gegenwart von TTFB

1. Relaxation in der Membran und an den Grenzflächen

In Gegenwart von TTFB wurden bei den Einschaltmessungen für $pH \geq pk_a$ mit steigendem pH-Wert in Relaxationsamplitude und Zeitkonstante zunehmende Relaxationseffekte gemessen. Bei einem pH-Wert $pH \gg pk_a$ können wir annehmen, daß nur Anionen in der Elektrolytphase vorliegen; d.h. der Strom wird nur von Anionen getragen.

Für den Fall des reinen Anionentransports wurde eine Theorie entwickelt, die die Relaxationseffekte in der Membran beschreibt.[28] Die Theorie geht davon aus, daß nach einem Spannungssprung die Anionen, die sich auf Grund des einleitend in diesem Kapitel beschriebenen Potentialprofils in den Grenzflächen der Membran befinden, eine Umlagerung in der Membran erfahren. Diese Umlagerung spiegelt sich in der gemessenen Relaxation bei den Strom-Zeit-Diagrammen, die mit Hilfe der Einschaltapparatur aufgenommen wurden, wider.

Die Umlagerung der Ionen von der einen Seite auf die andere Seite der Membran läßt sich mit einem exponentiellen Zusammenhang zwischen dem Strom I und der Zeit t beschreiben, wie er in der Theorie in der Arbeit von Ketterer et al. vorausgesagt wird. Ferner ist zu beachten, daß an Membranen in unserem System auch die Diffusionspolarisation den Strom-Zeitverlauf beeinflußt. Aus der Arbeit von Neumcke[2] kennen wir den Stromzeitverlauf für reine Diffusionspolarisation, wenn der Strom nur von einem Ladungsträger bestimmt wird.

Wenn wir, wie in unserem Fall, bei den Messungen in Gegenwart von TTFB sowohl bei pH Werten $pH < pK_a$ wie $pH = pK_a$ wie auch $pH > pK_a$ die Leitfähigkeit der Membran bestimmen, dann sind die Relaxationserscheinungen in und vor der Membran nicht mehr so übersichtlich, wie im Fall des reinen A^- Transports. Erstens haben wir zwei Transportmechanismen, nämlichen den Protonen-und den Anionentransport, die die Beschreibung der Relaxation in der Membran komplizieren; zweitens kennen wir nicht den zeitlichen Verlauf der Diffusionspolarisation mit chemischer Reaktion, wie wir sie etwa bei $pH \approx pK_a$ erwarten, so daß wir membraninnere und an den Grenzflächen auftretende Vorgänge nicht trennen können. Um diese Komplikationen zu vermeiden, beschränken wir uns auf die Leitfähigkeitswerte zur Zeit $t=0(\lambda^\circ)$, wo wir weder Diffusionspolarisation noch Umlagerung von Ionen in der Membran berücksichtigen müssen.

Der experimentell bestimmte Leitfähigkeitswert wird folgendermaßen definiert:

$$\lambda^\circ = \left(\frac{I_o}{U}\right)_{U \neq 0}$$

In unserem Fall beträgt die Spannung U immer etwa 33 bis 40 mV.

In der theoretischen Behandlung des modifizierten Bruner-Modells konnte gezeigt werden, daß die Ausdrücke für die λ_{∞} - Werte nur 4 Parameterkombinationen, nämlich $N_s K_+$, $N_s K_-$, $\frac{\gamma_+}{\beta_+}$ und $\frac{\gamma_-}{\beta_-}$ enthalten.

Bei geeigneter Variation der meßbaren Parameter pH und Entkopplerkonzentration C ist es gelungen, wie im folgenden gezeigt wird, aus den gemessenen λ° - Werten die 4 Parameterkombinationen zu bestimmen, und damit die Deutung der gemessenen Relaxationen zu umgehen.

2. Bestimmung von $\lambda_{t=0}$ (λ°) in Gegenwart von TTFB in Abhängigkeit vom pH und in Abhängigkeit von der Konzentration des zugegebenen TTFB

   2.1 Versuchsbedingungen für die Messungen mit TTFB

   TTFB ist eine in Wasser schwer lösliche Substanz. Der pK_a-Wert liegt bei pH = 5.04. Um TTFB in die wässrige Phase zu bringen, wurde eine alkoholische Stammlösung 6 mg/8 ml hergestellt, die dann auf die gewünschte Konzentration in Wasser verdünnt wurde. Mit spektroskopischen Messungen wurde festgestellt, daß eine etwa 10^{-5} M Lösung in dem pH-Bereich 3 - 10 hergestellt werden kann, während höhere Konzentrationen, wie sie bei Liberman[15] et al. berichtet werden, bei $pH < pK_a$ sich nicht mehr herstellen lassen.

   Um die Diffusionspolarisation im Bereich $pH \simeq pK_a$ auszuschließen, wurde mit 10^{-1} M Citrat bzw. 10^{-1} M Tris die Elektrolytlösung gepuffert. Die Lösungen enthielten ferner 10^{-1} M KCl. Die pH-Werte wurden mit KOH bzw. HCl eingestellt.

   Als Elektroden wurden in allen folgenden Versuchen ausschließlich Silber-Silberchloridelektroden verwendet.

2.2 Bestimmung von λ° in Abhängigkeit vom pH bei zwei verschiedenen Konzentrationen von TTFB

Bei Messung der pH-Abhängigkeit der Leitfähigkeit der Membranen wurden folgende Elektrolytlösungen angesetzt:

a. 10^{-5} M TTFB
10^{-1} M KCl
10^{-1} M Citrat
bzw. 10^{-1} M Tris

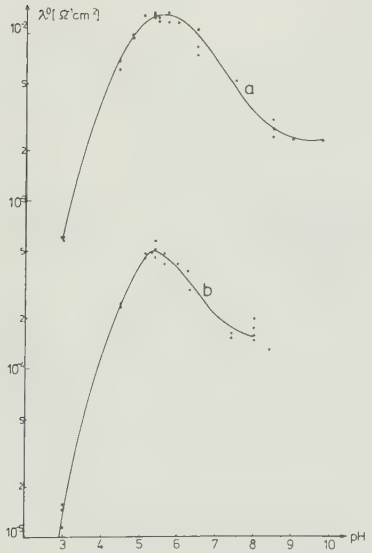
b. 10^{-6} M TTFB
10^{-1} M KCl
10^{-1} Citrat
bzw. 10^{-1} M Tris.

Citrat hat ein Puffergebiet von pH = 2.2 - 6.8, während Tris von pH=7.2 - 9.5 puffert.

Die Ausgangsspannung der Batterie des elektronischen Schalters betrug für diese Experimente 33 mV. Es wurde ein Meßwiderstand von 100 Ω gewählt.
Als Vorversuch wurde in Abwesenheit von TTFB die Leitfähigkeit in Gegenwart von Tris und Citrat gemessen. Es konnte keine Beeinflussung der Leitfähigkeit durch die beiden Puffersubstanzen gefunden werden. Bei 40 mV wurde ein Wert von etwa $2 \cdot 10^{-8}\ \Omega^{-1}\ cm^{-2}$ festgestellt. Alle Messungen wurden 20 min. nach Aufziehen der Membranen gemacht. Dies ist nötig, da wir mit der Zeit ein ständiges Zunehmen der Leitfähigkeit zu verzeichnen haben; d.h. wir müssen diese Art Drift auf einen Standardwert festlegen. Wir beobachten pro 10 min. eine Leitfähigkeitsänderung um ca. 15%.
Aus Fig. 38 ist zu sehen, daß wir bei pH = 5.30 ein Leitfähigkeitsmaximum haben, dessen Lage unabhängig von der Konzentration des Entkopplers ist. Ferner ist zu sehen, daß etwa bei pH $\geq$ 8 die Leitfähigkeit λ° einen konstanten pH-unabhängigen Wert annimmt, was auf einen reinen An-

ionentransport schließen läßt. Der Unterschied zwischen der Leitfähigkeit, die z.Zt. t=0 gemessen wurde, und der, die nach der Umlagerung der Ionen in der Membran bestimmt wurde, nimmt mit steigendem pH zu.

In Fig. 39 a,b,c werden 3 Oszillogramme dargestellt, die zeigen, daß bei pH = 3.0 die Relaxation völlig verschwindet, während bei pH = 5.3 eine merkliche Relaxation zu sehen ist; bei pH = 8.0 kann wegen der durch den Anionentransport hervorgerufenen Diffusionspolarisation der Leitfähigkeitswert nach der Relaxation in der Membran nicht mehr eindeutig bestimmt werden.



a. C = 10^{-5} M TTFB
b. C = 10^{-6} M TTFB
U = 33 mV
Beide Lösungen enthielten 10^{-1} M Citrat bzw. 10^{-1} M Tris und 10^{-1} M KCl.

Fig. 38 Abhängigkeit der Leitfähigkeit vom pH bei zwei verschiedenen TTFB Konzentrationen

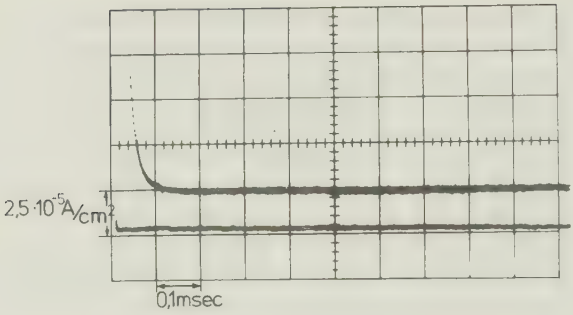


Fig. 39a
Oszillogramm einer Membran in Gegenwart von 10^{-5} M TTFB
pH = 3.0, 10^{-1} M Citrat, 10^{-1} M KCl
U = 40 mV, Empfindlichkeit 0.2 mV/cm, R_K = 100 Ω

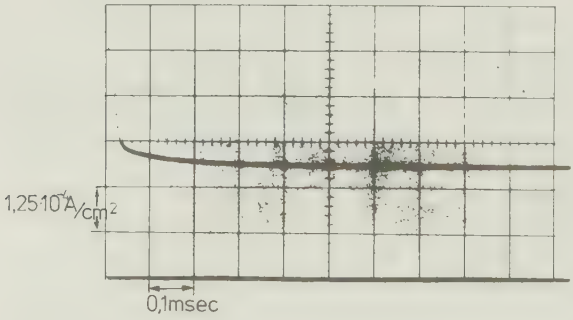


Fig. 39b
Oszillogramm einer Membran in Gegenwart von 10^{-5} M TTFB
pH = 5.3, 10^{-1} M Citrat, 10^{-1} M KCl
U = 33 mV, Empfindlichkeit 1 mV/cm, R_k = 100 Ω

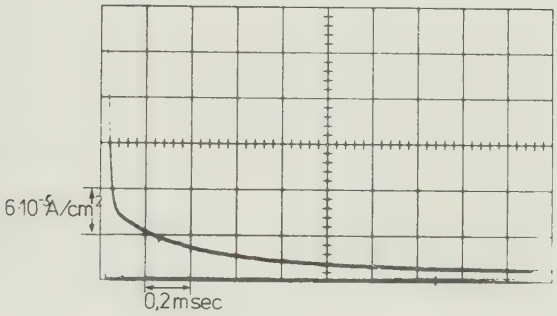


Fig. 39c
Oszillogramm einer Membran in Gegenwart von 10^{-5} M TTFB
pH = 8.0, 10^{-1} M Tris, 10^{-1} M KCl
U = 40 mV, Empfindlichkeit 0.5 mV/cm, R_k = 100 Ω

Fig. 40 zeigt einen typischen Stromzeitverlauf für eine Membran in 10^{-5} M TTFB bei pH = 6.05, wobei der Stromzeitverlauf halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen wurde.
a bedeutet den Aufladestrom der Kapazität.
b kann der Umlagerung der Ionen in der Membran zugeordnet werden, während c der Diffusionspolarisation zugeschrieben werden kann.
Die gestrichelte Linie bedeutet die Extrapolation des Stromes auf t=0, womit der Aufladestrom der Kapazität eliminiert wird.

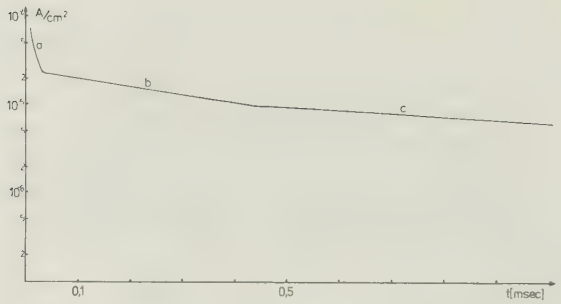


Fig. 40 Stromzeitverlauf einer Membran in Gegenwart von 10^{-5} M TTFB, 10^{-1} M Citrat, pH = 6.05

a Aufladestrom der Kapazität

b Relaxation in der Membran

c Relaxation, hervorgerufen durch Diffusionspolarisation

------ Extrapolation des Stromes auf t=0

2.3 Bestimmung der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration des TTFB

Die Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit wurde bei drei verschiedenen pH-Werten gemessen.

1. bei einem pH-Wert $pH > pK_a$
   d.h. wir erwarten einen reinen Anionentransport
2. bei $pH \cong pK_a$, wo Protonen- und Anionentransport zu erwarten sind
3. bei $pH < pK_a$, wo ein reiner Protonentransport zu erwarten ist

Es wurden folgende pH-Werte gewählt:

a pH = 8.0

b pH = 3.0

c $pH \cong pK_a = 5.3$

Fig. 41 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit bei pH = 8.0. Die Lösungen mit den verschiedenen Entkopplerkonzentrationen enthielten jeweils 10^{-1} M Tris und 10^{-1} M KCl. Bei pH = 8.0 haben wir einen reinen Anionentransport. Dies geht aus der in Fig. 38 dargestellten pH-Abhängigkeit hervor, wo wir bei $pH \geq 8$ für die Leitfähigkeit λ° einen konstanten Wert erhalten. Die in Fig. 41 dargestellte Konzentrationsabhängigkeit steht im Einklang mit dieser Vermutung. Bei genügend kleinen Konzentrationen erhalten wir eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der Leitfähigkeit, wie es in der Theorie vorausgesagt wird. Bei höheren Konzentrationen wird ein Sättigungsgebiet erreicht.

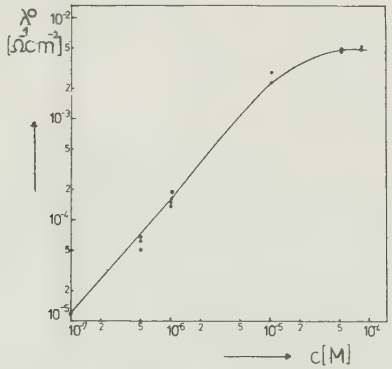


Fig. 41 Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit in Gegenwart von TTFB pH = 8.0
Alle Lösungen enthielten 10^{-1} M Tris und 10^{-1} M KCl

Fig. 42 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit bei pH = 3.0

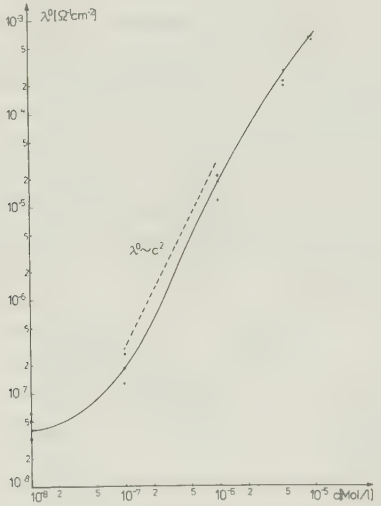


Fig. 42 Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit in Gegenwart von TTFB pH = 3.0
Alle Lösungen enthielten 10^{-1} M Citratpuffer und 10^{-1} M KCl

Bei pH = 3.0, wo wir einen fast reinen Protonenmechanismus erwarten, finden wir zwischen c = 10^{-7} M und c = 10^{-6} M TTFB eine quadratische Abhängigkeit zwischen Leitfähigkeit und Konzentration. Bei höheren Konzentrationen geht die Kurve in ein Sättigungsgebiet, das sich in der Kurvencharakteristik durch ein leichtes Abknicken von der quadratischen Beziehung bemerkbar macht. Bei kleinen Konzentrationen c < 10^{-7} M TTFB

geht die quadratische Beziehung in eine Kurve mit kleinerem Anstieg als 2 über. Dies kann mit einem Einschwenken der Kurve in die Grundleitfähigkeit erklärt werden, die etwa $2 - 5 \cdot 10^{-8}\ \Omega^{-1}\ cm^{-2}$ beträgt. Zudem wissen wir aus der Theorie, daß bei pH = 3.0 ein verschwindend kleiner Anionentransport zu beachten ist, den man bei den kleinen TTFB-Konzentrationen berücksichtigen muß (Fig. 49c), während er bei höheren Konzentrationen gegenüber dem Protonenmechanismus zu vernachlässigen ist.
Fig. 43 zeigt die Abhängigkeit zwischen der Leitfähigkeit und der Konzentration bei pH $\cong$ pK_a $\cong$ 5.3.

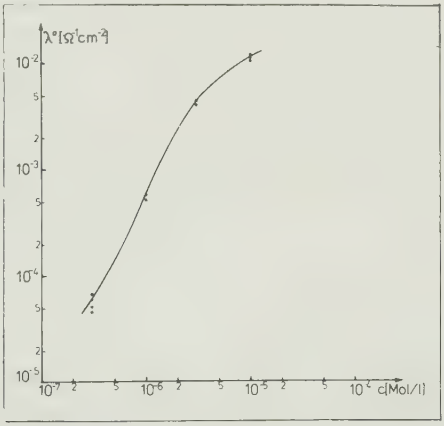


Fig. 43 Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit in Gegenwart von TTFB pH = 5.3
Alle Lösungen enthielten 10^{-1} M Citratpuffer und 10^{-1} M KCl

Bei pH = 5.3, wo wir sowohl einen Anionen- und einen Protonenmechanismus erwarten, finden wir bei genügend kleinen Konzentrationen eine quadratische Abhängigkeit zwischen Leitfähigkeit und Konzentration; d.h. daß bei diesem pH der Protonenmechanismus den Anionenmechanismus weit überwiegen muß. Ferner erhalten wir auch hier ein Abknicken in eine Sättigung; dies geht aus der Theorie hervor, da die Leitfähigkeit λ_{oo} sich additiv aus λ^{+}_{oo} , dem Protonentransport und λ^{-}_{oo} , dem Anionentransport zusammensetzt, die beide bei höheren Konzentrationen in eine Sättigungscharakteristik übergehen.

Zum Meßverfahren sei gesagt, daß bei pH = 3.0 bei Konzentrationen $c < 10^{-6}$ M der Strom stationär gemessen wurde. Dies scheint insofern gerechtfertigt, daß bei tiefen pH-Werten, wie aus Fig. 39a zu sehen ist, keine Relaxation beobachtet wird. Es wurden deshalb bei kleinen Konzentrationen keine Einschaltmessungen gemacht, da der Membranwiderstand unter diesen Bedingungen sehr hoch wird, und man den Ableitwiderstand entsprechend erhöhen muß; damit vergrößert sich auch die RC-Zeit τ entsprechend, womit eine Einschaltmessung zur Bestimmung des Stromes z.Zt. t = 0 sinnlos wird.

c) Anwendung des modifizierten Bruner-Modells auf die Experimente mit TTFB

Im modifizierten Bruner-Modell haben wir die Bestimmungsgleichungen für die vier Parameterkombinationen $N_S K_+$; $N_S K_-$; $\frac{\delta_+}{\beta_+}$; $\frac{\delta_-}{\beta_-}$ formuliert. Es ergaben sich je zwei Gleichungen für die Protonenleitfähigkeit λ^{+}_{oo} und die Anionenleitfähigkeit λ^{-}_{oo} mit und ohne Sättigungsterm.
Bei den Experimenten fanden wir bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Konzentration Sättigungseffekte für beide Transportmechanismen. Für pH = 3.0 und 5.3 ergaben sich die Sättigungseffekte bei Konzentrationen $c > 5 \cdot 10^{-6}$ M TTFB, während im alkalischen Gebiet bei pH = 8.0 bei $c > 10^{-5}$ M TTFB Sättigungseffekte auftreten.

Bei der Parameteranpassung wurden die Konzentrationsabhängigkeiten bei pH = 5.3 und pH = 8.0 benutzt. Die Gleichungen 24a und 25a, die keine Sättigungseffekte berücksichtigen, werden für die Resultate, die bei Konzentrationen $c < 10^{-6}$ M TTFB gefunden wurden, zur Bestimmung der Parameter verwendet, während bei $c > 10^{-6}$ M TTFB die Gleichungen 24 und 25, die Sättigungsterme enthalten, hinzugezogen werden.
Es wurden folgende experimentelle Werte eingesetzt:

pH = 8.0 :

$c = 10^{-6}$ M TTFB $\quad (\lambda_\infty)_{c\to\infty} = 1.7\cdot10^{-4}\,\Omega^{-1}cm^{-2}$

$c = 8\cdot10^{-5}$ M TTFB $\quad (\lambda^\circ) = 5\cdot10^{-3}\,\Omega^{-1}cm^{-2}$

pH = 5.3 :

$c = 3\cdot10^{-6}$ M TTFB $\quad (\lambda^\circ) = 4.3\cdot10^{-3}\,\Omega^{-1}cm^{-2}$

$c = 3\cdot10^{-7}$ M TTFB $\quad (\lambda^\circ)_{c\to0} = 5.5\cdot10^{-5}\,\Omega^{-1}cm^{-2}$

Es wurden folgende Werte berechnet:

$N_S K_+ = 1.1\cdot10^{-7}$ Mol/cm^{2}sec

$N_S K_- = 1.9\cdot10^{-9}$ "

$\frac{\gamma_+}{\beta_+} = 6.5\cdot10^{-7}$ M

$\frac{\gamma_-}{\beta_-} = 4.3\cdot10^{-5}$ M

Mit diesen 4 Parametern ist es möglich, die theoretischen Kurven von λ_∞ in Abhängigkeit vom pH zu berechnen, wie auch die Abhängigkeit von λ_∞ und der Konzentration c zu beschreiben.

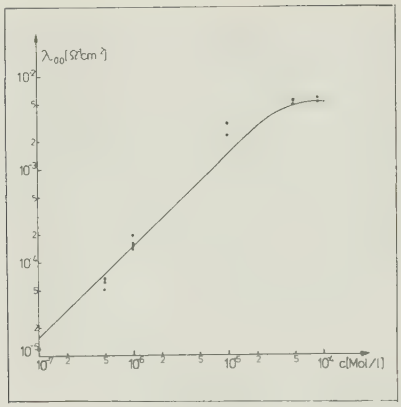


Fig. 44 Berechnete Kurve der Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit λ_{∞} bei pH = 8.0
Die experimentellen Daten sind als Punkte eingetragen

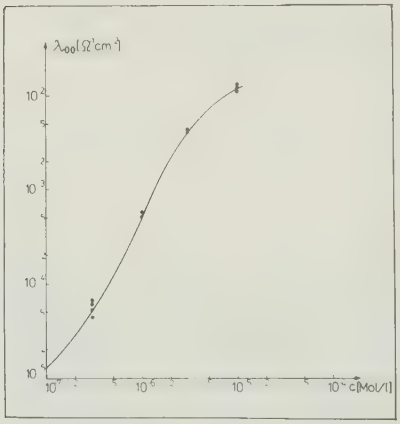


Fig. 45 Berechnete Kurve der Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit λ_{∞} bei pH = 5.3
Die experimentellen Daten sind als Punkte eingetragen

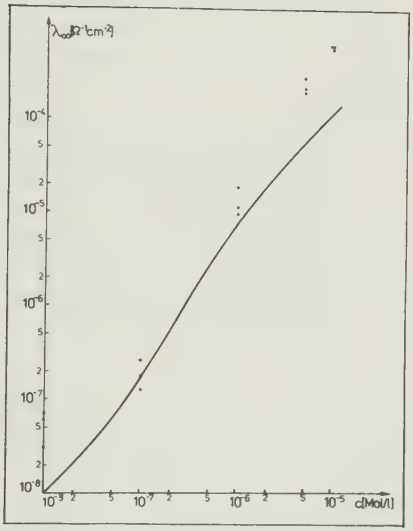


Fig. 46 Berechnete Kurve der Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit λ_∞ bei pH = 3.0
Die experimentellen Daten sind als Punkte eingetragen

Fig. 47 zeigt den mit obenstehenden Parameterwerten berechneten Verlauf der Leitfähigkeit als Funktion des pH bei c = 10^{-6} M und c = 10^{-5} M TTFB.

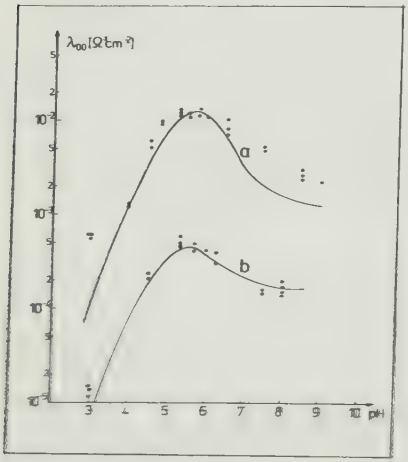


Fig. 47 Theoretisch berechnete Kurve der pH-Abhängigkeit der Leitfähigkeit
a c = 10^{-5} M TTFB
b c = 10^{-6} M "
Die experimentellen Daten sind als Punkte eingetragen

In Fig. 48 werden die aus der Theorie berechneten Werte für den Protonen- bzw. Anionentransportmechanismus in Abhängigkeit vom pH dargestellt.

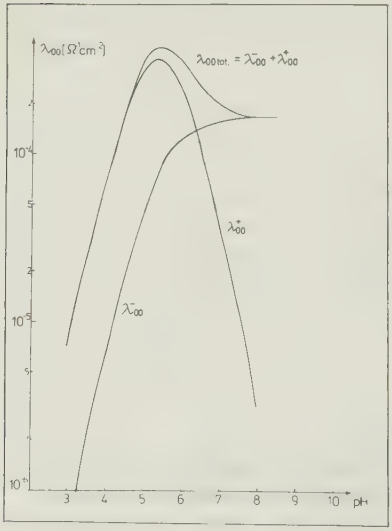


Fig. 48 Darstellung von als Summe der Einzelleitfähigkeiten in Abhängigkeit vom pH.
$c = 10^{-6}$ M TTFB

λ^{+}_{∞} Beitrag zum Protonenmechanismus

λ^{-}_{∞} Beitrag zum Anionenmechanismus

Aus den Figuren 49 a,b,c ist zu sehen, daß bei genügend großen Konzentrationen stets der Protonenmechanismus überwiegt. Dies ist aus der Theorie leicht einzusehen, da für $c \rightarrow \infty$ der Protonentransportmechanismus assymptotisch einem Endwert zustrebt, während die Leitfähigkeit, die durch die Anionen getragen wird, für $c \rightarrow \infty$ gegen Null geht.

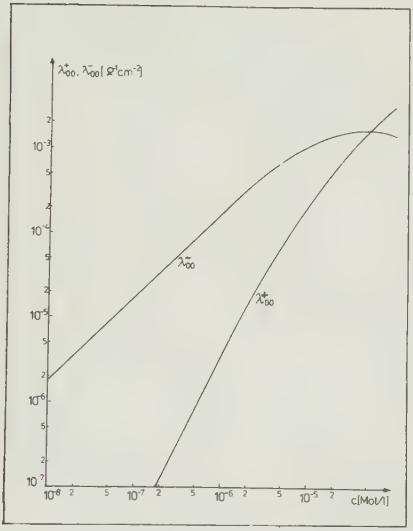


Fig. 49a Theoretisch berechnete Einzelleitfähigkeiten in Abhängigkeit von der Konzentration von TTFB pH = 8.0

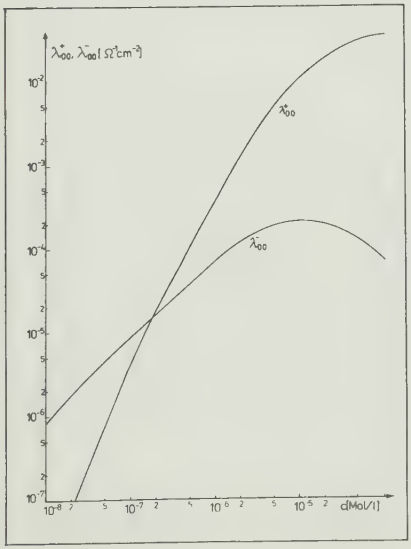


Fig. 49b Theoretisch berechnete Einzelleitfähigkeiten in Abhängigkeit von der Konzentration von TTFB pH = 5.3

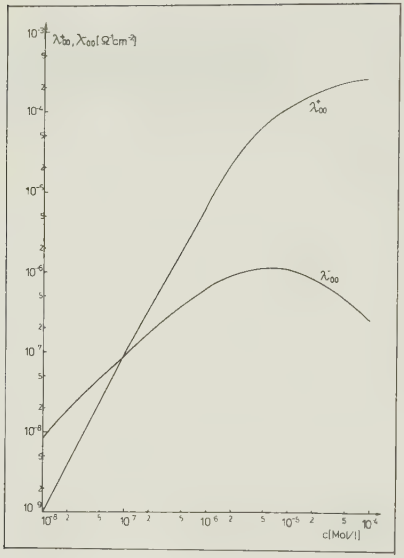


Fig. 49c Theoretisch berechnete Einzelleitfähigkeiten in Abhängigkeit von der Konzentration von TTFB pH = 3.0

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit haben wir gesehen, daß der Ionentransportmechanismus durch bimolekulare Lipidmembranen für einen Entkoppler, nämlich das TTFB, mit Hilfe des modifizierten Bruner-Modells erklärt werden kann.

Der entscheidende Schritt zu diesem Ergebnis war die Bestimmung des Stromes I zur Zeit $t=0 (I_o)$ bzw. der Leitfähigkeit λ^o mit Hilfe von Relaxationsmessungen. Dadurch konnten in der Ausführung der Theorie die Gleichgewichtsbedingungen zur Berechnung von λ_{oo} herangezogen werden. Zudem konnte mit den Messungen von I_o die Diffusionspolarisation, die in unserem Fall bei pH-Werten $pH < 8.0$ mit chemischer Reaktion auftritt, unberücksichtigt bleiben, und damit Verfälschungen des Ergebnisses durch Phänomene in der wässrigen Phase ausgeschlossen werden.

Die einzige meßtechnische Schwierigkeit ergab sich bei der Bestimmung von I_o über alle pH-Bereiche. Bei pH = 3.0 verschwindet die Relaxation des Stromes völlig. Die Oszillogramme werden unter der Annahme ausgewertet, daß $I_o = I_{stat}$ (I_{stat} = stationär gemessener Strom) ist; d.h. wir messen bei diesem pH weder eine Relaxation in der Membran noch Diffusionspolarisation.

Die vier Parameterkombinationen, von denen die theoretisch berechneten I_o-Werte abhängen, wurden aus den Experimenten bestimmt, die die Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit bei pH = 5.3 und pH = 8.0 beschreiben, d.h. es wurden nur solche Experimente zur Parameterbestimmung herangezogen, mit denen I_o gemessen wurde. Als Test für die Richtigkeit der Messungen wurde die Konzentrationsabhängigkeit bei pH = 3.0 berechnet und die theoretische Kurve mit der experimentellen Kurve verglichen. Dabei finden wir außerhalb des Sättigungsgebietes eine gute Übereinstimmung zwischen Experiment und

Theorie. Die Diskrepanz zwischen den theoretischen und experimentellen Werten bei pH = 3.0 innerhalb des Sättigungsgebietes (Fig.46) läßt sich damit erklären, daß N_S in der Beziehung

$$N_S = N_0 + N + N_-$$

über alle pH-Bereiche konstant angenommen wird. Es ist aber zu erwarten, daß die Gesamtkonzentration von Bindungsstellen in den Membrangrenzflächen (N_S) bei pH = 3.0 größer ist als bei pH = 8.0, weil die maximale Besetzungsdichte bei pH = 8.0 auf Grund der elektrostatischen Abstoßung der geladenen A^- Moleküle in der Membrangrenzfläche kleiner ist als bei pH = 3.0, wo man auf Grund der Beziehung (13)

$$\frac{\gamma_+}{\beta_+} \cdot \frac{1}{[H^+]} = \frac{N_-}{N} = \frac{6.5 \cdot 10^{-7}}{10^{-3}} = 6.5 \cdot 10^{-4}$$

ca. $2 \cdot 10^3$ mal mehr Bindungsstellen mit HA als mit A^- findet. Wegen der geringeren elektrostatischen Abstoßung zwischen Neutralmolekülen und Anionen erwartet man eine größere maximale Besetzungsdichte N_S. Wenn aber N_S im sauren Gebiet größer als im basischen Bereich ist, so erwarten wir experimentell kleinere Sättigungseffekte als wir sie mit den bei pH = 8.0 und 5.3 angepassten Parametern berechnen. Dies wurde, wie in Fig. 46 zu sehen ist, auch beobachtet.

Es sei noch hinzugefügt, daß der Schluß, daß die gemessene Relaxation bei pH = 5.3 nicht auf Diffusionspolarisation zurückzuführen ist, experimentell geprüft wurde. Es wurde der Stromzeitverlauf von Membranen in Gegenwart von 10^{-5} M TTFB bei pH = 5.3 aufgenommen, wobei die Pufferkonzentration zwischen 10^{-1} M Citrat und 1 M Citrat variiert wurde. Die Relaxationsamplitude zeigt keine Abhängigkeit von der Pufferkonzentration, so daß die Diffusionspolarisation, die bei

diesem pH-Wert in Bezug auf den Protonenmechanismus von der Konzentration des Puffers abhängig sein müßte, zu vernachlässigen ist.
Die physikalische Bedeutung der aus den I_o Werten bestimmten Parameterkombinationen wird an folgenden Beispielen geprüft:
Wir hatten folgende Werte gefunden.

$\frac{\gamma_+}{\beta_+} = 6.5 \cdot 10^{-7}$ M $\qquad N_S K_+ = 1.1 \cdot 10^{-7}$ Mol/cm^{2}sec

$\frac{\gamma_-}{\beta_-} = 4.3 \cdot 10^{-5}$ M $\qquad N_S K_- = 1.9 \cdot 10^{-9}$ Mol/cm^{2}sec

Wenn $\frac{\gamma_-}{\beta_-}$ in Gleichung (14) eingesetzt wird, so erhält man für pH = 8.0 und c = 10^{-5} M TTFB

$$\frac{\gamma_-}{\beta_-} \cdot \frac{1}{[A^-]} = \frac{N_o}{N_-} = 4.3$$

d.h. in der Membrangrenzfläche sind 4.3 mal mehr freie Bindungsstellen N_o als mit A^- besetzte Bindungsstellen N_-. Erhöht man die Konzentration um einen Faktor 10 auf 10^{-4} M, so errechnet sich für $\frac{N_o}{N_-} = 0.43$.

Wenn man bei dieser Konzentration einen reinen Anionentransport hätte, so hätte man experimentell ein Leitfähigkeitsmaximum feststellen müssen, da der maximale Strom erreicht wird, wenn $N_o = N_-$ d.h. wenn $\frac{N_o}{N_-} = 1$ ist.

Bei der Konzentration 10^{-4} M TTFB bei pH = 8.0 errechnet sich aus der Theorie, daß der Protonentransport größer ist als der Anionentransport. Es wurden folgende Werte berechnet:

a. für den Protonentransport $\lambda^+_{oo} = 3.2 \cdot 10^{-3}\ \Omega^{-1}\text{cm}^{-2}$
b. " " Anionen " $\lambda^-_{oo} = 1.5 \cdot 10^{-3}$ "

d.h. wir können in der Konzentrationsabhänigkeit der Leitfähigkeit bei pH = 8.0 nur bis Konzentrationen von etwa $c < 10^{-5}$ M, wo λ^{+}_{∞} gegenüber λ^{-}_{∞} vernachlässigt werden kann, den Anionenmechanismus als vorwiegenden Transport betrachten (Fig.49a). Bei pH = 12 müsste man experimentell ein Leitfähigkeitsmaximum bestimmen können, da wir dann den reinen Anionentransport über alle Konzentrationsbereiche haben; leider ist es nicht möglich, bei so stark alkalischen Lösungen zu messen, da die Membranen bei so hohen pH-Werten instabil sind.

Die Auswertung der Parameter $\frac{\gamma_+}{\beta_+} = 6.5 \cdot 10^{-7}$ M ergibt folgende Ergebnisse aus der Beziehung (13)

$$\frac{N_-}{N} = \frac{\gamma_+}{\beta_+} \cdot \frac{1}{[H^+]}$$

Bei pH = 3.0 hatten wir gesehen, daß $2 \cdot 10^3$ mal mehr Bindungsstellen mit HA als mit A^- besetzt sind; für pH = 8.0 finden wir, daß 67 mal mehr Anionen als neutrale HA-Moleküle sich in den Bindungsstellen aufhalten.

Ein weiterer Test für die Richtigkeit der aus den Experimenten bestimmten Parameter sind die Bedingungen für das Fehlen von Sättigungseffekten bei hohem und tiefem pH. Beziehung (30) sagt aus, daß für kleinen pH

$$\frac{\gamma_-}{\beta_-} \cdot \frac{\gamma_+}{\beta_+} \cdot \frac{1}{K} \gg c$$ sein muss.

Einsetzen der Zahlenwerte liefert

$$\frac{4.3 \cdot 10^{-5} \cdot 6.5 \cdot 10^{-7}}{5 \cdot 10^{-6}} = 5.5 \cdot 10^{-6} \text{ M} \gg c$$

Experimentell wurde festgestellt, daß bei pH = 3.0 die Konzentrationsabhängigkeit zwischen 10^{-6} und 10^{-7} M außerhalb des Sättigungsbereiches sich befindet. Die Theorie ergibt auch hier bei zu kleinen Konzentrationen Sättigungseffekte; dieser Umstand ist wieder mit der schon diskutierten Abhängigkeit der maximalen Besetzungsdichte N_S vom pH zu verstehen.

Für den alkalischen Bereich bei pH = 8.0 haben wir die Beziehung (31) für das Fehlen von Sättigung

$$\frac{\delta_-}{\beta_-} \gg c \quad , \text{ oder}$$

$$4.3 \cdot 10^{-5}\ \text{M} \gg c.$$

Das Fehlen von Sättigung wurde bei pH = 8.0 bei Konzentrationen zwischen c = 10^{-7} und 10^{-6} M experimentell festgestellt, d.h. wir haben eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment.

Aus den Zahlenwerten der Parameter $N_S K_+$ und $N_S K_-$ können wir das Verhältnis K_+/K_- bilden:

$$\frac{K_+}{K_-} = \frac{N_S K_+}{N_S K_-} = \frac{1.1 \cdot 10^{-7}}{1.9 \cdot 10^{-9}} = 60$$

Dies bedeutet, daß die Sprungrate K_+ für die Protonen 60 mal größer ist als die Sprungrate K_-, die den Anionentransport in der Membran beschreibt.
Wenn man aus der Arbeit von Ketterer et al. den Wert $N_S = 5 \cdot 10^{12}$ Molek/cm^2 übernimmt, dann kann auch K_+ und K_- einzeln bestimmt werden. Dies scheint insofern zulässig,

da für die beiden in dieser Arbeit untersuchten Anionen (Dipicrylamin, Tetraphenylbor), die durch die Membran transportiert werden, die gleiche maximale Besetzungsdichte gefunden wurde.

Es ergibt sich:

$$K_+ = \frac{1.1 \cdot 10^{-7} \cdot 6 \cdot 10^{23}}{5 \cdot 10^{12}} = 1.3 \cdot 10^{4} \text{ sec}^{-1}$$

$$K_- = \frac{1.9 \cdot 10^{-9} \cdot 6 \cdot 10^{23}}{5 \cdot 10^{12}} = 2.2 \cdot 10^{2} \text{ sec}^{-1}$$

Für das Dipicrylaminanion, das ebenfalls ein Entkoppler ist, wurde ein Wert von $K_- = 380 \text{ sec}^{-1}$ gefunden.

An Hand der Ergebnisse, die bei der Auswertung der Parameter gefunden wurden, haben wir gesehen, daß das Modell im ohm'schen Grenzfall über alle Konzentrationsbereiche und pH-Werte mit Ausnahme der Sättigungseffekte bei pH = 3.0 die Messungen richtig wiedergibt. Das Leitfähigkeitsmaximum in Abhängigkeit vom pH bei $pH \cong pK_a$ ergab sich zwangsläufig aus der Theorie.

Allerdings muß gesagt werden, daß das vorliegende Modell nicht unbedingt den Mechanismus von allen Entkopplern, die als schwache organische Säuren vorliegen, und die das Leitfähigkeitsmaximum in Abhängigkeit vom pH verursachen, beschreiben muß. Es gibt einige Hinweise dafür, daß andere Entkoppler sich in der Konzentrationsabhängigkeit anders verhalten, als das in dieser Arbeit behandelte TTFB. Es wurde gezeigt, allerdings nur mit stationären Messungen, daß z.B. in Gegenwart von FCCP[M] eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Leitfähigkeit besteht.

Mit der in unserer Arbeit entwickelten Theorie kann aber auch der Mechanismus in Gegenwart von FCCP erklärt werden. Dadurch, daß man im Fall von FCCP eine lineare Beziehung zwischen Leitfähigkeit und Konzentration findet, kann man annehmen, daß im wesentlichen nur Anionen durch die Membran transportiert werden, und daß der Protonenmechanismus gegenüber dem Anionenmechanismus vernachlässigt werden kann.

Da die Leitfähigkeit in Gegenwart von FCCP nur mit stationären Messungen bestimmt wurde, kann man das Leitfähigkeitsmaximum in Abhängigkeit vom pH der Lösung folgendermaßen erklären:
Mit zunehmendem pH nimmt die Konzentration von Anionen zu, d.h. wenn wir annehmen, daß der Strom im wesentlichen durch die lipidlöslichen Anionen getragen wird, verzeichnen wir zunächst eine Zunahme des Stroms. Mit steigender Anionenkonzentration macht sich aber auch die Diffusionspolarisation immer stärker bemerkbar infolge der zunehmenden Stromdichte vor der Membran. Durch diesen Umstand nimmt die stationär gemessene Leitfähigkeit mit steigendem pH immer mehr ab.[30]

Mit Relaxationsmessungen müsste nach unserer Theorie man im Fall des FCCP mit steigendem pH eine stetig ansteigende Leitfähigkeit λ^{o} finden, die bei pH $\gg pK_a$ einen konstanten Wert annehmen müßte. Diese Messungen konnten mit der in dieser Arbeit verwendeten Spannungssprungapparatur nicht ausgeführt werden, da die Leitfähigkeitserhöhung im Fall von FCCP zu klein ist und somit ein zu großer Ableitwiderstand gewählt werden müßte, der die RC-Zeit τ in dem Stromzeitverlauf zu groß hätte werden lassen.

E. Zusammenfassung

Am Modellsystem der bimolekularen Lipidmembran wurde der Transportmechanismus von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung mit Leitfähigkeitsmessungen untersucht.
Zu diesem Zweck wurde eine Apparatur angefertigt, mit der es möglich ist, mit verschiedenen Methoden die elektrische Leitfähigkeit solcher Membranen zu bestimmen.
Es wurden folgende Resultate gefunden:

1. Stromspannungskurven von Lipidmembranen zeigen eine starke Nichtlinearität. Dieses Phänomen wurde untersucht, um mit Hilfe der vorhandenen Theorien (Ioneninjektionsmechanismus, Spiegelladungsmodell) Aufschluß über den Mechanismus in Gegenwart von Entkopplern zu bekommen. Es konnte gezeigt werden, daß der Ioneninjektionsmechanismus keinen messbaren und das Spiegelladungsmodell einen in vielen Fällen zu schwachen Beitrag liefert, um die Nichtlinearitäten zu erklären.

2. Entkopplersubstanzen beeinflussen die Membranleitfähigkeit in der Art, daß die Leitfähigkeit in Abhängigkeit vom pH der wässrigen Phase bei dem pK_a-Wert des Entkopplers ein Maximum durchläuft. Dies konnte mit stationären Messungen bestätigt werden. Gleichzeitig wurde gezeigt, daß stationäre Messungen für eine Aufklärung des Transportmechanismus nicht ausreichen.

3. Der Einfluß auf die Leitfähigkeit der Membranen wurde in Gegenwart von TTFB mit Hilfe von Relaxationsmessungen untersucht. Dabei wurde die Feldsprungmethode angewendet. Dadurch kann die

Leitfähigkeit zur Zeit t=0 (λ°) bestimmt werden. Diese Methode hat den Vorteil, daß bei der theoretischen Berechnung der Leitfähigkeit die Gleichgewichtskonzentrationen eingesetzt werden können. Es wurde eine Theorie entwickelt, die den Ionentransport von Entkopplern quantitativ beschreibt. Um den Ladungstransport zu verstehen, wurden Bindungsstellen für neutrale bzw. geladene Entkopplermoleküle in der Form von HA bzw. A^- in der Grenzfläche der Membran angenommen. Dabei soll es möglich sein, daß ein Proton bzw. ein Anion von der einen Seite der Membran auf die andere Seite springen kann.
Die Existenz solcher Bindungsstellen läßt sich physikalisch begründen.
Es konnte mit diesem Modell die Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit für beliebige pH-Werte beschrieben werden. Insbesondere ergab sich eine Deutung für den Befund, daß bei $pH < pK_a$ die Leitfähigkeit quadratisch bei $pH > pK_a$ dagegen linear von der Konzentration abhängt. Außerdem ergab sich das Leitfähigkeitsmaximum in Abhängigkeit vom pH zwangsläufig bei $pH \simeq pK_a$.
Der Anteil der Leitfähigkeit, der jeweils dem Protonen- bzw. dem Anionenmechanismus zugeschrieben wird, kann mit der in dieser Arbeit entwickelten Theorie quantitativ erfaßt werden.

F. Literaturverzeichnis

1. Lehninger, A.,L., Watkins, C.,L., Cooper, C., Devlin,T.,M., and Gamble, J., L.jr.
Oxidative phosphorylation
Science (1958) 128, 450 - 456

2. Robertson, J., D.
The ultrastructure of all membranes and their derivatives
Bioch. Society Symp. (1959) 16, 3 - 43

3. Davson, H. and Danielli, J., F.
The permeability of natural membranes
2 end ed. Cambridge Univ. Press (1952) London, N. York

4. Green, D., E.,D. W. Allmann, E. Bachmann,H. Baum, K. Kopaczyk, E. F. Korman, S. Lipton, D. H. Mac Lennan, D. C. Mc Connel, J. F. Perdue, J. S. Rieske and A. Tzagaloff
Formation of membranes by repeating units
Arch. Biochem. Biophys. 119 (1967), 312

5. Benson, A., A.
Lipid function in plant membranes
Intern. Congr. Bioch. 7th Tokyo (1967) III: 525 Abstr.

6. P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott
Reconstitution of excitable membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system
Nature 194 (1962) 979

7. T. E. Thompson
The properties of bimolecular phosphdlipid membranes.
In "Cellular Membranes Development"
ed. by M. Locke 1964 Acad. Press, New York and London

8. H. T. Tien and A. Louise Diana
Bimolecular lipid membranes: A review and summary of recent studies
Chem. Phys. Lipids 2 (1968), 55

9. P. Mitchell
Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation
Biol. Rev. 41 (1966), 445

10. H. T. Tien
J. of Theor. Biol. 16 (1967), 97
Black lipid membranes: Thickness determination and molecular organization by optical methods

11. Vetter K.
Elektrochemische Kinetik
Springer 1961, Berlin

12. B. Neumcke
Diffusion polarization at lipid bilayer membranes
Biophysik 7 (1971), 95

13. B. Ketterer
Dissertation, Konstanz (1971)

14. E. C. Robles and D. von den Berg
Synthesis of lecithins by acylation of o-(sn-Glycero-3-phosphoryl) choline with fatty acid anhydrides
Biochem. Biophys. Acta 187 (1969), 520

15. E. A. Liberman, V. P. Topaly
Selective transport of ions through bimolecular phospholipid membranes
Biochem. Biophys. Acta 163 (1968), 125

16. D. E. Burton, A. J. Lambie, J. C. L. Ludgate, G. T. Newbold, A. Percival and D. T. Saggers
2-Trifluoromethylbenzimidazoles: A new class of herbicidal compounds
Nature 208 (1965) 1166

17. T. Hanai, A. Haydon and J. L. Taylor
An investigation by electrical methods of lecithin in hydrocarbon films in aqueous solutions
Proc. Roy. Soc. 281 A (1964) 377

18. W. Lesslauer, J. Richter, and P. Läuger
Some electrical properties of bimolecular phosphatidylinositol membranes
Nature 213 (1967), 1224

19. D. Walz, E. Bamberg, P. Läuger
Nonlinear electrical effects in lipid bilayer membranes
I. Ion injection
Biophys. J. (1969) 9, 1150

20. B. Neumcke and P. Läuger
Nonlinear electrical effects in lipid bilayer membranes
II. Integration of the generalized Nernst-Planck Equation
Biophys. J. 9 (1969), 1160

21. Born, M.
Z. Physik 1 (1920) 45

22. B. Neumcke, D. Walz and P. Läuger
Nonlinear electrical effects in lipid bilayer membranes
III. The dissociation field effect
Biophys. J.10 (1970), 172

23. U. Hopfer, A.L. Lehninger, T.E. Thompson
Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes
induced by agents for oxidative phosphorylation
Proc. Natl. Am. Soc. 59 (1968), 484

24. Markin, V.S., kristalik L.I., Liberman, E.A., Topaly, V.P.
Mechanism of conductivity of artificial phospholipid
membranes in presence of ion carriers
Biofizika 14 (1969) 256

25. E.J.A. Lea and P.C. Croghan
The effect of 2,4 Dinitrophenol on the properties of
thin phospholipid films
J.Membrane Biol.1 (1969), 225

26. L.J. Bruner
Blocking phenomena and charge transport through membranes
Biophysik 6 (1970), 241

27. P. Läuger
Physicochemical studies with artificial lipid membranes
Atti del Seminario di Studi Biologici, Vol. IV (1969)
ed. by E. Quagliariello

28. B. Ketterer, B. Neumcke and P. Läuger
Transport mechanism of hydrophobic ions through lipid
bilayer membranes
J.Membrane Biol. im Druck

29. E. A. Liberman and V. P. Topaly
Transfer of ions across bimolecular membranes and classification of uncouplers of oxidative phosphorylation
Biofizika 13 (1968), 1025

30. O. H. Le Blanc jr.
The effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on lipid bilayer membranes: Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone
J. Membrane Biol. 4 (1971), 227

Lebenslauf

Am 9. November 1940 wurde ich, Ernst Bamberg , in Krefeld/Deutschland geboren.
Ab 1947 besuchte ich die Grundschule in Krefeld bzw. nach dem Umzug meiner Eltern nach Lörrach die Grundschule in Lörrach bis Herbst 1950. Danach besuchte ich das Humanistische Gymnasium in Lörrach, wo ich meine Schulausbildung mit der Reifeprüfung Ostern 1960 abschloß.
Im April des gleichen Jahres begann ich das Studium der physikalischen Chemie an der Universität Basel. In den Jahren 1967, 1968 und 197o legte ich die Nebenfachexamina in Physik, Nationalökonomie und Chemie ab.
Die vorliegende Dissertation begann ich im Sommer 1967 unter Anleitung von Herrn P. D. Dr. P. Läuger am Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Basel.
Nachdem im Frühjahr 1968 Herr Dr. Läuger einem Ruf auf einen Lehrstuhl der Universität Konstanz gefolgt war, begleitete ich ihn nach Konstanz und setzte an der dortigen Universität die Arbeit an meiner Dissertation fort.
Während meines Studiums besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der Herren Professoren und Dozenten K. Alder, E. Baumgartner, G. Bombach, P. Buchner, R. Conzelmann, H. Dahn, P. Diehl, M. Eichler, H. Erlenmeyer, S. Fallab, F. Grün,P. Huber, W. Kuhn, E. Miescher, P. Scherrer, H.R. Striebel, R. Wagner und H.P. Widmaier.